



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DIRLEI DIEDRICH KIELING

**APLICAÇÃO DE DERIVADOS DE CAPIM-LIMÃO EM
ALIMENTOS E BEBIDAS E AVALIAÇÃO DAS
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, ANTIOXIDANTES E
SENSORIAIS**

DIRLEI DIEDRICH KIELING

**APLICAÇÃO DE DERIVADOS DE CAPIM-LIMÃO EM
ALIMENTOS E BEBIDAS E AVALIAÇÃO DAS
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, ANTIOXIDANTES E
SENSORIAIS**

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Prudencio.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Kieling, Dirlei Diedrich.

Aplicação de derivados de capim-limão em alimentos e bebidas e avaliação das propriedades físico-químicas, antioxidantes e sensoriais / Dirlei Diedrich Kieling. - Londrina, 2016.
128 f.

Orientador: Sandra Helena Prudencio.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Bebidas mistas - Tese. 2. Avaliação sensorial - Tese. 3. Capim-limão - Tese. 4. Atividade antioxidante - Tese. I. Prudencio, Sandra Helena . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

DIRLEI DIEDRICH KIELING

**APLICAÇÃO DE DERIVADOS DE CAPIM-LIMÃO EM ALIMENTOS E
BEBIDAS E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS,
ANTIOXIDANTES E SENSORIAIS**

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e
Doutorado em Ciência de Alimentos da
Universidade Estadual de Londrina, como requisito
parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de
Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Prudencio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Rúbia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Tatiana Colombo Pimentel
Instituto Federal do Paraná - IFPR

Prof. Dr. Fábio Yamashita
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Marta de Toledo Benassi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 4 de novembro de 2016.

Aos meus pais, Lucia e Cirilo,
Ao meu esposo, Gilberto, e
Ao nosso anjinho da guarda, Eloá,
Dedico!

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Sandra Helena Prudencio, pelas orientações, conselhos, atenção, disponibilidade, amizade e apoio em todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor PhD. Gustavo V. Barbosa-Cánovas, pela orientação, amizade e apoio no desenvolvimento de uma das etapas deste trabalho e pela oportunidade de aprendizado.

Ao Professor Dr. José Roberto Pinto de Souza, Diretor do Centro de Ciências Agrárias, pelo cultivo do capim-limão e apoio no desenvolvimento da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Doutorado e da bolsa PDSE.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

À Professora Dra. Marta de Toledo Benassi, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pela atenção e cuidado dispensados a mim e a todos os alunos.

Aos Professores dos Programas de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, por compartilharem generosamente seus conhecimentos, contribuindo para minha formação.

À minha querida estagiária Melissa Delarco, prestativa e dedicada, por toda ajuda na parte experimental.

Aos colegas e amigos Alessandra, Andrea, André, Bruna Yoshida, Karla, Cíntia, Danielle, Fernando, Julyene, Marcela, Maria Rita, Mariah, Marli, Marsílvio, Melissa Pagnan, Natália, Rodolfo, Sabrina e Talita, pela atenção, amizade e companheirismo, pela troca de ideias e experiências e por toda a ajuda dispensada.

Aos amigos da *Washington State University* Charles, Cindy, Jaza, Prashant, Semanur e Taíse, pela convivência e amizade dentro e fora da Universidade, pelo apoio em todos os momentos e, principalmente, por terem sido nossa família nos Estados Unidos.

Ao Frank Younce, técnico e administrador da Planta Piloto de Processamento de Alimentos da Escola de Ciência de Alimentos da *Washington State University*, pelos treinamentos, atenção e disponibilidade.

À Sandra Rezende, secretária da Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, e às técnicas dos laboratórios Patrícia, Alessandra, Marli e Neusa, pela atenção e prestatividade.

À Léia Z. Menegas, do Departamento de Qualidade da General Mills & Yoki, pela consulta técnica sobre bebidas de soja.

A todos que doaram um pouco do seu tempo e se dispuseram a participar dos testes sensoriais, obrigada pela valiosa ajuda.

Aos Professores que gentilmente aceitaram o convite para fazer parte da banca examinadora.

Ao meu amado esposo Gilberto, por acreditar tanto em mim e ser meu pilar de sustentação ao longo destes anos, por seu amor e apoio incondicionais, por abraçar os desafios junto comigo.

À minha mãe, meu pai (*in memoriam*) e irmãos pelas orações, incentivo, carinho e cuidado que a mim sempre dedicaram.

A Deus que me guia, fortalece e inspira todos os dias.

"Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante".

(Antoine de Saint-Exupéry)

KIELING, Dirlei Diedrich. **Aplicação de derivados de capim-limão em alimentos e bebidas e avaliação das propriedades físico-químicas, antioxidantes e sensoriais**. 2016. 128 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O capim-limão é popularmente conhecido pelo seu uso no preparo de chá, por infusão ou cocção das folhas. No entanto, seu sabor e aroma agradáveis e refrescantes possibilitam seu uso no preparo de bebidas mistas com sucos de frutas, com ou sem soja. Bebidas mistas, contendo ingredientes naturais, têm despertado o interesse do consumidor que busca por produtos ligados ao conceito de saúde e bem-estar. Estas matérias-primas, capim-limão, lima ácida e soja, apresentam uma potencial capacidade antioxidante atribuída principalmente aos compostos fenólicos presentes (ácidos fenólicos e flavonoides) e vitamina C. Diante disso, o trabalho de pesquisa teve por objetivo obter e avaliar a utilização de derivados de capim-limão na elaboração de bebidas mistas com propriedades antioxidantes e qualidade sensorial, bem como investigar a aplicação de extrato hidro-etanólico de capim-limão como antioxidante natural em peito de frango processado armazenado em refrigeração. Inicialmente, foram obtidos o extrato aquoso, o extrato liofilizado e o óleo essencial de capim-limão, os quais foram utilizados na formulação de concentrados de capim-limão com suco de lima ácida Tahiti, sendo determinadas suas características físico-químicas e atividade antioxidante. As bebidas mistas preparadas a partir dos concentrados foram analisadas sensorialmente por consumidores em potencial (teste de aceitação de atributos) e por uma equipe de julgadores selecionados e treinados (perfil sensorial quantitativo). Foi também realizado um estudo para determinar as condições de pressão e tempo para processamento das bebidas mistas de capim-limão e lima ácida por Alta Pressão Hidrostática (APH). Os parâmetros físico-químicos e microbiológicos, concentração de compostos bioativos e capacidade antioxidante da bebida mista tratada por APH foram determinadas, no dia do processamento (tempo zero) e ao longo de oito semanas de armazenamento a 4 °C, e comparados às características das bebidas mistas não tratada (controle) e pasteurizada. Foram, ainda, elaboradas bebidas mistas de capim-limão e lima ácida com soja, sendo determinadas suas características físico-químicas, capacidade antioxidante e aceitação por consumidores em potencial. Por fim, foi obtido um extrato hidro-etanólico de capim-limão e foi investigada sua atividade antioxidante, em termos de inibição da oxidação lipídica, bem como seu efeito na estabilidade de peito de frango processado durante 60 dias de armazenamento a 4 °C. A partir dos resultados obtidos, os concentrados contendo derivados de capim-limão (extrato aquoso, liofilizado e óleo essencial) e suco de lima ácida foram caracterizados como produto ácido, de cor amarela, fonte de compostos bioativos (vitamina C e fenólicos), com potencial antioxidante. As bebidas mistas preparadas a partir de concentrados contendo extrato aquoso ou extrato liofilizado e óleo essencial apresentaram maior intensidade de aroma e sabor de capim-limão e maior aceitabilidade. Os concentrados originaram bebidas mistas de capim-limão e lima ácida sensorialmente apreciadas e potencialmente benéficas à saúde dos consumidores. As condições estabelecidas para o processamento da bebida mista por APH foram 250 MPa por 1 min a 25 °C, capazes de garantir segurança microbiológica em testes de inativação com *Listeria innocua*, sem perdas significativas de vitamina C e fenólicos totais. A bebida mista tratada por APH manteve o conteúdo original de compostos bioativos (no dia do processamento) e apresentou características físico-químicas mais próximas da bebida não tratada em comparação com a bebida pasteurizada termicamente. O processamento por APH melhorou a qualidade

microbiológica e aumentou a vida útil da bebida não tratada em 19 dias, evidenciando que consiste em uma alternativa confiável ao tratamento térmico de bebida mista de capim-limão e lima ácida. As bebidas mistas de capim-limão e lima ácida com soja apresentaram características físico-químicas diferenciadas em relação às bebidas mistas sem soja. A adição de extrato de soja às bebidas mistas aumentou o teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante contra radicais ABTS^{•+}, enquanto que a adição de extrato aquoso de capim-limão aumentou a capacidade antioxidante contra radicais DPPH[•]. Sensorialmente, as bebidas mistas de capim-limão e lima ácida com soja apresentaram aroma e sabor agradáveis e tiveram boa aceitação, podendo ser consideradas uma fonte viável de compostos bioativos para os consumidores. O extrato hidro-etanólico de capim-limão apresentou potencial para uso como antioxidante natural, sendo que sua adição ao peito de frango processado inibiu a oxidação lipídica e a formação de ácidos graxos livres, peróxidos e TBARS, contribuindo para a estabilidade físico-química do produto durante 60 dias de armazenamento refrigerado.

Palavras-chave: *Cymbopogon citratus*. Lima ácida. Soja. Peito de frango. Alta Pressão Hidrostática. Fenólicos.

KIELING, Dirlei Diedrich. **Application of lemongrass derivatives in food and beverages and assessment of physicochemical, antioxidants and sensory properties.** 2016. 128 p. Thesis (Doctoral Degree in Food Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Lemongrass is popularly known for its use in the preparation of tea, by infusion or cooking the leaves. However, its pleasant and refreshing flavor and aroma enable its use in the preparation of mixed beverages with fruit juices and with or without soy. Mixed beverages containing natural ingredients, has called the attention of the consumer who search for products linked to the concept of health and wellness. These raw materials, lemongrass, lime and soy, have a potential antioxidant capacity mainly attributed to the phenolic compounds (phenolic acids and flavonoid) and vitamin C. Thus, the research work aimed to obtain and evaluate the use of lemongrass derivatives in the preparation of mixed beverages with antioxidant properties and sensory quality, as well as investigating the use of hydro-ethanolic extract of lemongrass as a natural antioxidant in processed chicken breast stored under refrigeration. Initially, the aqueous extract, lyophilized extract and the essential oil of lemongrass were obtained and then used in the formulation of lemongrass concentrates with Tahiti lime juice, and the physicochemical characteristics as well as the antioxidant activity were determined. The mixed beverages prepared from the concentrates were sensory analyzed by potential consumers (acceptance test of attributes) and by selected and trained assessors (descriptive analysis). It was also carried out a study to determine the conditions of pressure and time for processing of the mixed beverages of lemongrass and lime by High Hydrostatic Pressure (HHP). The physicochemical and microbiological parameters, concentration of bioactive compounds and antioxidant capacity of the mixed beverages treated by HHP were determined on the day of processing (time zero) and over eight weeks of storage at 4 °C, and compared to the characteristics of the mixed beverages untreated (control) and pasteurized. Also, mixed beverages of lemongrass and lime with soy were prepared, and their physicochemical characteristics, antioxidant capacity and acceptance by potential consumers were determined. Finally, a hydro-ethanolic extract of lemongrass was obtained and its antioxidant activity was investigated in terms of the lipid oxidation inhibition, as well as its effect on the stability of processed chicken breast during 60 days of storage at 4 °C. From the results, the concentrates containing lemongrass derivatives (aqueous extract, lyophilized extract and essential oil) and lime juice were characterized as acidic product, yellow, source of bioactive compounds (vitamin C and phenolic), with antioxidant potential. The mixed beverages prepared from concentrates containing aqueous extract or lyophilized extract and essential oil had higher intensity of lemongrass aroma and flavor and greater acceptability. The concentrates led to mixed beverages of lemongrass and lime sensorially appreciated and potentially beneficial to the consumer's health. The conditions set for the processing of the mixed beverage by HHP were 250 MPa for 1 min at 25 °C, able to ensure microbiological safety in inactivation tests with *Listeria innocua*, without significant losses of vitamin C and total phenolic. The mixed beverage treated by HHP kept the original content of bioactive compounds (on the day of processing) and presented physicochemical characteristics closer to the untreated beverage compared to the thermally pasteurized beverage. The HHP processing improved the microbiological quality and increased the shelf life of the untreated beverage in 19 days, highlighting that consists of a reliable alternative to the thermal treatment of lemongrass-lime mixed beverage. The mixed beverages of lemongrass and lime with soy

presented physicochemical characteristics differentiated in relation to mixed beverages without soy. The addition of soy extract to the mixed beverages increased the total phenolic content and antioxidant capacity against ABTS^{•+} radical cation, while the addition of lemongrass aqueous extract increased the antioxidant capacity against DPPH[•] radical. Sensorially, the mixed beverages of lemongrass and lime with soy showed pleasant aroma and flavor and had good acceptance, being considered a viable source of bioactive compounds for consumers. The hydro-ethanolic extract of lemongrass has shown potential for use as a natural antioxidant, and its addition to the processed chicken breast inhibited the lipid oxidation and the formation of free fatty acids, peroxides and TBARS, contributing to the physical and chemical stability of the product for 60 days of cold storage.

Keywords: *Cymbopogon citratus*. Lime. Soy. Chicken breast. High Hydrostatic Pressure. Phenolics.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Estrutura química dos 12 isômeros de isoflavonas da soja 24

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Figure 1 – Projections of descriptive sensory attributes (a) and mixed beverages formulations (b) in the factorial plan (PC1 vs. PC2)..... 58

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Figure 1 – Growth curve of *Listeria innocua* in TSBYE at 37 °C..... 68

Figure 2 – Enumeration of *L. innocua* in the mixed beverage before and after HHP treatment 74

Figure 3 – Growth of total mesophiles (A) and molds and yeast (B) on lemongrass-lime mixed beverage during cold storage..... 76

Figure 4 – Physicochemical parameters of lemongrass-lime mixed beverage during storage..... 80

Figure 5 – Color parameters of lemongrass-lime mixed beverage after processing and during storage 81

ARTIGO CIENTÍFICO 3

Figure 1 – Principal components analysis for physicochemical parameters (vectors) and beverages formulations (F) 94

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Table 1 – Formulations of liquid concentrates	47
Table 2 – Attributes, definitions and references list developed by the sensory panel to describe the mixed beverages	51
Table 3 – Physicochemical characteristics of Tahiti lime juice and liquid concentrates	54
Table 4 – Color parameters of lemongrass derivatives and liquid concentrates	54
Table 5 – Total phenolic content and antioxidant activity of lemongrass derivatives and liquid concentrates	55
Table 6 – Means of the sensory attributes and purchase intent of mixed beverage prepared from liquid concentrates	59

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Table 1 – Vitamin C and total phenolic content of lemongrass-lime mixed beverage before and after HHP treatment at different process conditions	73
Table 2 – Multiple correlation analysis of physicochemical parameters on HHP processed lemongrass-lime mixed beverage	77

ARTIGO CIENTÍFICO 3

Table 1 – Formulations of the mixed beverages.....	89
Table 2 – Physicochemical characteristics of the mixed beverages	96
Table 3 – Acceptance of the sensory attributes of the soy-based beverages	99

ARTIGO CIENTÍFICO 4

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos de peito de frango logo após o processamento e ao longo do armazenamento refrigerado	113
--	-----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Capim-limão	20
3.2	Limão / Lima Ácida	21
3.3	Soja	22
3.4	Goma Xantana	25
3.5	Compostos Fenólicos	26
3.6	Radicais Livres e Antioxidantes	26
3.6.1	<i>Métodos para Determinação da Capacidade Antioxidante</i>	31
3.7	Sucos e Bebidas Mistas Prontas para Consumo	35
4.	REFERÊNCIAS	37
5.	MATERIAL E MÉTODOS	43
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43

	ARTIGO CIENTÍFICO 1: <i>Development of Concentrates for the Preparation of Lemongrass- Lime Mixed Beverage: Physicochemical, Antioxidant and Sensory Properties</i>	44
	ABSTRACT	44
1.	Introduction	44
2.	Material and Methods	46
2.1	Material	46
2.2	Lemongrass Derivatives	46
2.3	Lemongrass Essential Oil Emulsion	47
2.4	Tahiti Lime Juice	47

2.5	Formulations of Concentrates.....	47
2.6	Physicochemical Analyses.....	48
2.7	Determination of Total Phenolic Compounds	48
2.8	Determination of Antioxidant Activity.....	49
2.8.1	<i>DPPH assay</i>	49
2.8.2	<i>ABTS assay</i>	49
2.9	Sensory Analysis of Mixed Beverages	49
2.9.1	<i>Descriptive Analysis</i>	50
2.9.2	<i>Acceptance Test</i>	51
2.10	Experimental Design and Statistical Analysis.....	52
3.	Results and Discussion	52
3.1	Yield and Physicochemical Properties	52
3.1.1	<i>Color</i>	53
3.2	Phenolics.....	55
3.3	Antioxidant Activity	56
3.4	Sensory Analysis of Mixed Beverages Prepared From the Concentrates	57
3.4.1	<i>Descriptive Analysis</i>	57
3.4.2	<i>Acceptance</i>	60
4.	Conclusion	61
	References	61

	ARTIGO CIENTÍFICO 2: <i>Effects of High Hydrostatic Pressure Treatment on Physicochemical and Microbiological Parameters, Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Lemongrass-Lime</i>	64
	ABSTRACT	64
1.	Introduction	64
2.	Material and Methods	67
2.1	Chemicals and culture media.....	67
2.2	Mixed beverage preparation	67
2.3	Inoculum preparation.....	68
2.4	High hydrostatic pressure processing	69
2.5	Thermal Pasteurization	69
2.6	Shelf-life Study	70
2.7	Physicochemical Analyses.....	70

2.7.1	<i>pH, acidity and Brix</i>	70
2.7.2	<i>Color</i>	70
2.7.3	<i>Bioactive compounds</i>	71
2.7.3.1	<i>Ascorbic acid</i>	71
2.7.3.2	<i>Total Phenolic Compounds</i>	71
2.8	Antioxidant capacity.....	71
2.9	Microbiological analysis.....	71
2.10	Statistical analysis.....	72
3.	Results and Discussion	72
3.1	Establishing the conditions of the HHP treatment.....	72
3.3	Shelf-life study.....	75
4.	Conclusion	82
	References	83

ARTIGO CIENTÍFICO 3: *Evaluation of the Attributes of Physicochemical and Sensory Quality of a New Soy-based Beverage with Lemongrass and Lime Juice* 86

	ABSTRACT	86
1.	Introduction	86
2.	Material and Methods.....	88
2.1	Material	88
2.2	Preparation of the beverages.....	88
2.4	pH, acidity and Brix.....	90
2.5	Color.....	91
2.6	Ascorbic acid.....	91
2.7	Total phenolic compounds.....	91
2.8	Antioxidant capacity.....	91
2.9	Acceptance of attributes.....	92
2.10	Statistical analysis.....	92
3.	Results and Discussion	92
3.1	Physicochemical parameters of the beverages.....	92
3.3	Sensory attributes.....	99
4.	Conclusion	100
	References	101

ARTIGO CIENTÍFICO 4: Avaliação do Efeito de Extrato de Capim-Limão na Estabilidade de Peito de Frango Processado, Embalado a Vácuo e Armazenado em Temperatura de Refrigeração.....	104
RESUMO.....	104
1. Introdução	104
2. Material e Métodos	106
2.1 Material.....	106
2.2 Preparo e Caracterização do Extrato de Capim-Limão	107
2.2.1 <i>Determinação de Compostos Fenólicos Totais</i>	107
2.2.2 <i>Determinação da Atividade Antioxidante</i>	107
2.3 Processamento do Peito de Frango	108
2.4 Análises Físico-Químicas no Produto	108
2.4.1 <i>Determinação da Acidez e do Índice de Peróxidos</i>	108
2.4.2 <i>Determinação de TBARS</i>	109
2.4.3 <i>Cor</i>	109
2.4.4 <i>Atividade de Água</i>	109
2.5 Análises Microbiológicas	110
2.6 Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	110
3. Resultados e Discussão	110
4. Conclusão.....	116
Referências	116
CONCLUSÕES.....	119
ANEXO: TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS.....	121

1. INTRODUÇÃO

O grande desafio da Ciência de Alimentos é conciliar a praticidade exigida pela vida moderna, onde se tem pouco tempo para preparação de alimentos, com a manutenção da saúde da população. Os alimentos precisam estar prontos ou semi-prontos para consumo, ter durabilidade, ser sensorialmente agradáveis e microbiologicamente seguros, sem perder o aspecto saudável e o valor nutritivo. Pesquisas atuais sobre consumo revelam que na linha de bebidas a população também procura por produtos saudáveis e práticos. Assim, o consumo de bebidas prontas que contém ingredientes naturais ligados ao conceito de saúde e bem-estar, como sucos de frutas, extratos vegetais e chás, continua em crescimento.

Tradicionalmente, estes produtos são preservados por tratamentos térmicos que, embora inativem eficientemente microrganismos e enzimas, acabam afetando negativamente as propriedades sensoriais e nutritivas, devido às altas temperaturas empregadas. Diante disso, tecnologias alternativas (não térmicas) de preservação de alimentos e bebidas têm sido investigadas, as quais são capazes de alcançar os mesmos níveis de segurança do alimento que os tratamentos térmicos, preservando os aspectos sensoriais e nutritivos e permitindo, ainda, maior retenção de compostos bioativos. Entre estas tecnologias destaca-se a alta pressão hidrostática (APH). Comparativamente aos tratamentos térmicos, alimentos e bebidas processados por APH apresentam-se mais nutritivos, mais saudáveis e, sensorialmente, assemelham-se aos produtos frescos, atraindo a atenção de pesquisadores e consumidores.

Seguindo a tendência de saúde e bem-estar, o consumo diário de chás preparados a partir de ervas medicinais, folhas e flores de plantas também encontra-se bastante difundido entre a população em geral. O chá de *Cymbopogon citratus*, popularmente conhecido como capim-limão, capim-santo ou capim-cidreira, possui inúmeras aplicações terapêuticas, sendo utilizado principalmente como chá calmante, no alívio do stress, no combate à febre e para dores em geral. Os extratos de capim-limão contêm compostos bioativos, como ácidos fenólicos e flavonóides, os quais conferem propriedades antioxidantes e de saúde.

A lima ácida Tahiti, popularmente conhecida como limão Tahiti, é amplamente utilizada no preparo de alimentos e bebidas, com a função de conferir aos produtos sabor refrescante e agradável ao paladar, além de contribuir com componentes nutritivos e antioxidantes como vitamina C e flavonóides. Por se tratar de uma fruta que não apresenta entressafra, está disponível no mercado o ano todo, facilitando sua utilização.

Durante muito tempo, no Ocidente, o extrato de soja foi considerado um produto de sabor desagradável. No entanto, com o lançamento das novas bebidas à base de soja pela

indústria Brasileira, contendo extrato de soja, sucos de frutas, aromatizantes e saborizantes, este tipo de bebida passou a representar um volume importante das vendas de sucos prontos para consumo. Com a diversificação de sabores, somada às campanhas de marketing e à divulgação de pesquisas evidenciando as propriedades benéficas para a saúde da soja, as bebidas com soja têm conquistado a população, levando a um aumento no consumo deste tipo de bebida nos últimos anos.

Os principais consumidores das bebidas à base de soja são pessoas preocupadas em ter uma alimentação saudável e promover a saúde, assim como os que buscam uma alternativa ao leite, por apresentarem intolerância à lactose, alergia às proteínas do leite, hipercolesterolemia ou por opção pessoal (veganos). Nesse aspecto, as principais marcas deste ramo alimentício têm investido em pesquisas, visando alinhar seus novos produtos à expectativa do consumidor. A nova tendência é o desenvolvimento de bebidas à base de soja com sabores refrescantes como “limonada suíça”, “chá verde com limão”, entre outros.

Embora a indústria de alimentos e bebidas tenha disponibilizado uma grande variedade de sucos prontos para consumo, inclusive com a tendência recente de associar sucos de frutas com chás, como chá branco, chá verde e chá mate, com ou sem adição de soja, ainda não existe no mercado nenhum tipo de bebida pronta para consumo contendo suco de lima ácida e capim-limão. No entanto, na região Sul do Brasil o capim-limão é utilizado no preparo de bebida caseira com suco de limão, muito apreciada devido ao seu sabor agradável e refrescante.

Visando atender à demanda dos consumidores por produtos alimentícios saudáveis e práticos, o peito de frango processado pronto para uso surgiu como uma boa opção para o preparo rápido de sanduíches naturais e outros pratos. No entanto, devido ao elevado teor de ácidos graxos insaturados, ao processamento aplicado e à necessidade de conservação por certo período de tempo, torna-se imprescindível a adição de antioxidantes a este produto. Como a inocuidade dos antioxidantes sintéticos tem sido questionada, a indústria alimentícia vem buscando alternativas naturais para prevenir a oxidação lipídica. Embora tenham sido desenvolvidos estudos com extratos de plantas como potenciais antioxidantes naturais, ainda não foram avaliados os efeitos do extrato de capim-limão na conservação de peito de frango desfiado ou de outro produto alimentício.

Assim, identificou-se no capim-limão um grande potencial a ser explorado em pesquisas na área de Ciência e Tecnologia de alimentos, as quais poderão ser absorvidas futuramente pela indústria de alimentos e bebidas, de modo que as características sensoriais peculiares desta matéria-prima, bem como os aspectos funcionais, possam ser bem

aproveitados, tanto em termos de benefícios para a saúde quanto para a conservação e manutenção da qualidade dos alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obter, caracterizar e avaliar o emprego de derivados de capim-limão na elaboração de bebidas mistas com propriedades antioxidantes e qualidade físico-química, microbiológica e sensorial, bem como investigar a aplicação de extrato de capim-limão como antioxidante natural em peito de frango processado armazenado em refrigeração.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter os derivados de capim-limão (extrato aquoso, liofilizado e o óleo essencial) e determinar suas características físico-químicas e atividade antioxidante;
- Desenvolver concentrados contendo derivados de capim-limão (extrato aquoso, liofilizado e o óleo essencial) para o preparo de bebidas mistas com capim-limão e lima ácida;
- Determinar as propriedades físico-químicas e antioxidantes dos concentrados elaborados;
- Identificar e quantificar os atributos sensoriais das bebidas mistas com capim-limão e lima ácida preparadas a partir dos concentrados, utilizando perfil sensorial descritivo;
- Avaliar a aceitação dos atributos sensoriais das bebidas mistas com capim-limão e lima ácida preparadas a partir dos concentrados, utilizando escala hedônica estruturada de 9 pontos;
- Determinar as condições de processamento para tratamento térmico (pasteurização) e não térmico (alta pressão hidrostática) das bebidas mistas com capim-limão e lima ácida;
- Avaliar as características físico-químicas, microbiológicas e atividade antioxidante das bebidas mistas com capim-limão e lima ácida (controle, pasteurizada termicamente e tratada por alta pressão hidrostática) logo após processamento e durante 60 dias de armazenamento refrigerado;
- Elaborar bebidas mistas de capim-limão, lima ácida e soja e investigar o efeito da adição de extrato de soja nas propriedades antioxidantes e na aceitação das bebidas mistas;
- Obter um extrato hidro-etanólico de capim-limão, caracterizá-lo e avaliar o seu efeito na estabilidade de peito de frango processado durante 60 dias de armazenamento refrigerado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Capim-limão

O *Cymbopogon citratus* Stapf é uma espécie originária da Índia, trazida para o Brasil possivelmente no período colonial, época em que era utilizado como planta ornamental. Pertence à família Poaceae e se constitui em uma planta perene, que forma touceiras compactas e robustas de até 1,2 m de altura. É também denominado popularmente de capim-limão, capim-santo, capim-de-cheiro ou capim-cidreira (COSTA et al., 2005; SILVA et al., 2010).

É uma planta aromática, amplamente utilizada para fins medicinais, sobretudo na forma de chá, preparado por infusão ou cocção das folhas. Com o uso das folhas de capim-limão já foram constatadas atividades sedativa, depressora do sistema nervoso central, analgésica, antimicrobiana e fungistática (MARTINAZZO et al., 2010). Tem aplicações nas indústrias de cosméticos, perfumaria e farmacêuticas, encontrando-se entre as dez plantas medicinais e aromáticas mais produzidas no Brasil (SANTOS et al., 2013). É também utilizada em preparações alimentícias, devido ao seu aroma de limão, especialmente na culinária Asiática. Segundo o conhecimento popular, é indicada para febre, alterações digestivas, dores em geral e como calmante. A planta também é aproveitada com finalidades agronômicas para composição de cercas-vivas e na contenção de encostas para evitar a erosão, mas a sua maior importância econômica reside na produção do óleo essencial (FIGUEIRINHA et al., 2008; COSTA et al., 2005).

O óleo essencial encontrado nas folhas é constituído de substâncias apolares, principalmente o citral (65-86%) e o citronelal (7-8%), além de β -mirceno e eugenol, em menor quantidade. O citral apresenta-se em maior quantidade nas folhas jovens e é esta a substância responsável pelo aroma de limão, atribuído à planta (SILVA et al., 2010). De acordo com Costa et al. (2005), o óleo essencial possui atividades antimicrobiana e antifúngica já comprovadas em 22 espécies de microrganismos. Devido ao seu aroma característico, é largamente utilizado pela indústria de cosméticos e de aromas.

Figueirinha et al. (2008) fracionaram os componentes fenólicos de extratos de *Cymbopogon citratus* Stapf para estabelecer o perfil de fenólicos e a relação entre as estruturas dos flavonoides e o efeito protetor contra espécies reativas de oxigênio (EROs). Foram identificados taninos, ácidos fenólicos (caféico e p-cumárico) e flavonas glicosídicas (apigenina e luteolina) nos extratos. As frações de taninos e de flavonóides apresentaram

maior capacidade de inativação de EROs. Na fração de flavonoides, que representou 6,1% do extrato (em peso seco), foram identificados treze compostos (O- e C-glicosilflavonas).

Marques e Farah (2009) analisaram o conteúdo de ácidos clorogênicos e compostos relacionados em 14 plantas medicinais e suas infusões. Entre as plantas com teores significativos de ácidos clorogênicos estavam *Ilex paraguariensis*, *Camellia sinensis*, *Melissa officinalis* e *Cymbopogon citratus* (9,7 g.100g⁻¹ a 84,7 mg.100g⁻¹). Foram encontrados valores semelhantes de ácidos clorogênicos totais tanto nas infusões quanto nos extratos metanólicos das plantas, indicando que ocorre uma extração satisfatória destes compostos na infusão. Os autores destacaram as propriedades benéficas dos ácidos clorogênicos em humanos, como efeito antioxidante, hepatoprotetor e hipoglicêmico.

3.2 Limão / Lima Ácida

A lima ácida Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka), popularmente conhecida pelos brasileiros como limão Tahiti, é provavelmente originária da Califórnia, EUA, sendo o Brasil o quarto maior produtor mundial de limas e limões. Os frutos pesam, em média, 70 a 100 g e o suco representa, aproximadamente, metade da massa total do fruto, com teor médio de sólidos solúveis totais (SST) ou °Brix de 9%, acidez total titulável de 6% e conteúdo de ácido ascórbico (vitamina C) entre 20 e 40 mg.L⁻¹ (BATISTA, 2010).

A produção nacional de lima ácida Tahiti possui três mercados bastante distintos: mercado interno, processamento industrial e a exportação de frutos *in natura*. Embora o mercado interno seja o principal destino da produção, o aumento das exportações brasileiras da fruta merece destaque (BREMER NETO et al., 2010). A lima ácida Tahiti é a quinta fruta mais exportada do Brasil e se constitui em uma das mais expressivas dentre as cítricas (EMBRAPA, 2016).

A lima ácida Tahiti não tem uma entressafra, pois está disponível no mercado o ano todo, e tem ampla aceitação, sendo utilizada no preparo de alimentos, sucos e refrigerantes (PEDRÃO et al., 1999) e na fabricação de sucos concentrados, óleos essenciais e pectina cítrica (BATISTA, 2010). As condições recomendadas para a sua conservação são temperatura entre 10 e 12 °C e umidade relativa (UR) entre 85-95%, podendo os frutos ser armazenados nestas condições por 4 a 8 semanas (JOMORI et al., 2003). Pertencente à classe de frutas cítricas, desempenha um importante papel na alimentação humana, principalmente na forma de fruta fresca e suco (REBEQUI et al., 2009). A lima ácida Tahiti é apreciada pelo

consumidor por ser uma fruta rica em acidez, perfumada, de casca fina e sem sementes (DURIGAN; MATTIUZ; DURIGAN, 2005).

A incorporação de suco de limão/lima ácida às bebidas, além de agregar componentes nutricionais como vitamina C, ácido fólico, niacina e piridoxina, tem por finalidade conferir ao produto sabor refrescante e agradável ao paladar, incrementando seu sabor e suavizando a doçura por promover mudança na relação entre o teor de sólidos solúveis e a acidez titulável (OLIVEIRA et al., 2007).

Os extratos de frutas cítricas, como limão e lima ácida, são importantes fontes de ácidos fenólicos, como os ácidos hidroxicinâmicos, e de flavonoides (flavononas e flavonóis). Esses compostos podem agir como antioxidantes, inativando radicais livres ou metais pró-oxidantes (LUZIA; JORGE, 2010).

Pedrao et al. (1999) avaliaram o efeito da adição de sacarose (55 e 60 g/100 g) e tempo de armazenamento a -18 °C nas propriedades físico-químicas e sensoriais de suco concentrado de lima ácida Tahiti. Para o preparo do suco para consumo, a diluição de 1:6 do suco concentrado foi considerada a melhor diluição para o atributo “sabor de limão” em testes pareados, tanto para 55 g quanto para 60 g de sacarose por 100 g de suco. A diluição do suco concentrado (1:6) contendo 60 g de sacarose por 100 g de suco originou uma limonada de boa aceitabilidade, com características físico-químicas compatíveis com bebidas de lima/limão.

3.3 Soja

O grão da soja (*Glycine max*) apresenta na sua composição proteínas (40%), carboidratos (35%), lipídios (20%) e minerais (5%) (b.s). As principais proteínas da soja são as proteínas de reserva, glicininas e β -conglucininas, que representam 65 a 80% das proteínas totais do grão. As proteínas da soja apresentam um excelente perfil de aminoácidos, sendo deficientes somente em aminoácidos sulfurados. Somado à qualidade nutricional, outros efeitos biológicos são atribuídos às proteínas da soja, incluindo diminuição dos níveis de colesterol, propriedade anti-hipertensiva, atividade imunomodulatória e atividade anticancerígena (MURPHY, 2008).

Em 1999 o *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) aprovou uma alegação de saúde para a proteína de soja e doença cardíaca coronária com base nos efeitos hipocolesterolêmicos da proteína de soja, a qual continua válida, mas está em processo de revisão (FDA, 2016). No entanto, resultados de análises indicam que esses efeitos são mais modestos do que os inicialmente relatados. Ainda assim, os alimentos de soja podem ajudar a

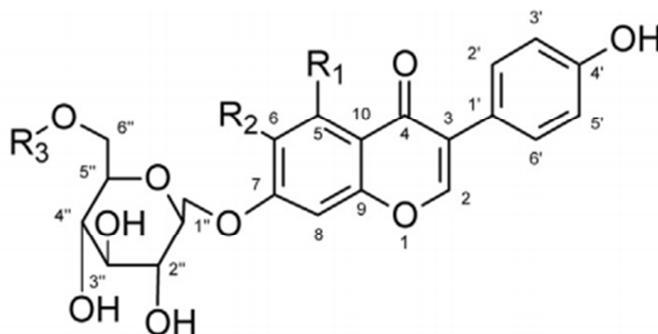
diminuir o nível do colesterol médio da população, quando consumidos em substituição a outras fontes alimentares comuns de proteínas, uma vez que os alimentos de soja fornecem proteína de alta qualidade, mas são pobres em gordura saturada e desprovidos de colesterol. Além disso, existem evidências de que os alimentos de soja podem propiciar benefícios coronários independentes de lipídios, provavelmente devido às isoflavonas (MESSINA; LANE, 2007). No Brasil, em 2002, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) aprovou a alegação funcional de que o consumo diário de no mínimo 25 g de proteína de soja, associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis, poderia ajudar a reduzir o colesterol (BRASIL, 2002). Em 2016, a Anvisa atualizou a lista das alegações de propriedade funcional ou de saúde e os requisitos específicos, sendo que a alegação para proteína de soja ainda permanece válida (BRASIL, 2016).

Os derivados protéicos da soja, como extrato em pó, farinhas desengorduradas, isolados, concentrados e texturizados protéicos são amplamente utilizados na indústria alimentícia em decorrência de suas propriedades funcionais tecnológicas. Esses produtos, além do elevado teor proteico, podem conter quantidades apreciáveis de isoflavonas (95 a 711mg/100g), quando comparados com o grão de soja (110 mg/100 g) (BARBOSA et al., 2006). Os efeitos benéficos associados ao consumo regular da soja e derivados parecem depender da concentração de isoflavonas, cuja quantidade ingerida deve ser de aproximadamente 50 mg por dia (CALLOU, 2009).

Silva et al. (2010) e Góes-Favoni et al. (2004) determinaram teores de isoflavonas totais de 91,93 a 180 mg/100 g em extratos de soja em pó comerciais. Segundo os autores, os teores de isoflavonas dos produtos derivados de soja variam em função da cultivar de soja, do método de processamento e das condições ambientais, sendo a temperatura durante o desenvolvimento do grão o fator mais importante.

As isoflavonas estão amplamente distribuídas no reino vegetal, mas concentrações relativamente maiores são encontradas na soja. Estes compostos podem estar presentes na soja e produtos de soja em quatro formas químicas distintas: na forma livre, as chamadas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), ou nas formas glicosiladas, ligados a açúcares, denominados β -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), acetilglicosídeos (6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina e 6''-O-acetilglicitina) e malonilglicosídeos (6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilgenistina e 6''-O-malonilglicitina), totalizando 12 isômeros (Figura 1). Porém, somente as isoflavonas livres (agliconas), sem a molécula de açúcar, são facilmente absorvidas no intestino delgado humano, enquanto que as isoflavonas glicosiladas são fracamente absorvidas, devido ao seu peso molecular e hidrofobicidade. As enzimas

hidrolíticas (β -glicosidases) naturalmente presentes na soja ou produzidas pela microbiota intestinal são responsáveis por converter as formas glicosiladas de isoflavonas em agliconas (LIMA; IDA, 2014; ESTEVES; MONTEIRO, 2001).



Grupo	Isoflavona	R ₁	R ₂	R ₃
Agliconas	Daidzeína	-H	-H	-
	Genisteína	-OH	-H	-
	Gliciteína	-H	-OCH ₃	-
β -glicosídeos	Daidzina	-H	-H	-H
	Genistina	-OH	-H	-H
	Glicitina	-H	-OCH ₃	-H
Acetilglicosídeos	6''-O-acetildaidzina	-H	-H	-COCH ₃
	6''-O-acetilgenistina	-OH	-H	-COCH ₃
	6''-O-acetilglicitina	-H	-OCH ₃	-COCH ₃
malonilglicosídeos	6''-O-malonildaidzina	-H	-H	-COCH ₂ COOH
	6''-O-malonilgenistina	-OH	-H	-COCH ₂ COOH
	6''-O- malonilglicitina	-H	-OCH ₃	-COCH ₂ COOH

Figura 1 – Estrutura química dos 12 isômeros de isoflavonas da soja (LIMA; IDA, 2014).

As isoflavonas presentes na soja e derivados podem trazer benefícios para saúde da população como redução da incidência de alguns tipos de câncer (mama, próstata e cólon), controle da diabetes *mellitus* e redução do risco de doenças cardiovasculares. Outros benefícios das isoflavonas para a saúde incluem redução dos sintomas climatéricos e redução do risco da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. Os mecanismos pelos quais as isoflavonas podem exercer estes efeitos parecem depender da sua atividade anti-estrogênica e de outras propriedades bioquímicas, tais como inibição da atividade enzimática da tirosina quinase, e da sua atividade antioxidante (GEORGETTI et al., 2008; ESTEVES; MONTEIRO, 2001).

A capacidade antioxidante das isoflavonas está relacionada com o número de grupos hidroxila presente na sua estrutura química. A capacidade antioxidante decresce com a glicosilação ou a substituição do grupo hidroxila pelo grupo metoxila. Assim, as agliconas

apresentam capacidade antioxidante maior do que as formas glicosiladas e entre as três agliconas destaca-se a genisteína. As isoflavonas podem inibir a peroxidação lipídica *in vitro*, inativando radicais livres ou atuando como quelante de metais pró-oxidantes (BARBOSA et al., 2006).

3.4 Goma Xantana

A goma xantana é um heteropolissacarídeo produzido por espécies de bactérias do gênero *Xanthomonas*, obtida por fermentação e utilizada como aditivo alimentar (BORGES; VENDRUSCOLO, 2008). A presença de cadeias aniônicas a torna solúvel em água quente ou fria e estável em soluções ácidas; outra característica importante da xantana é que não há mudanças perceptíveis na viscosidade da solução na faixa de temperatura de 0 a 100 °C, o que a torna única entre as gomas alimentícias (BEMILLER; HUBER, 2010, p.119). Normalmente, é utilizada em pequena quantidade em alimentos (1 a 3 g por litro) e em um grande número de aplicações, como agente de suspensão, estabilizador de emulsão, intensificador de espuma ou potencializador de volume da massa (CARGILL FOODS, 2016).

O heteropolissacarídeo é composto por glicose, manose e ácido glucurônico, além de quantidades variáveis de ácido pirúvico e acético. A cadeia linear da goma xantana é formada por unidades de β -1,4-D-glicose, enquanto as cadeias laterais são formadas por um ácido D-glucurônico a cada duas unidades de D-manose. Aproximadamente 50% das unidades de D-manose terminal contém um resíduo de ácido pirúvico ligado pelo cetogruppo na posição C-4 e C-6. A presença de ácido acético e pirúvico torna a goma xantana um polissacarídeo aniônico (ZHAO et al., 2009).

A goma xantana tem sido amplamente utilizada pela indústria de alimentos, devido às propriedades reológicas das suas soluções aquosas (comportamento pseudoplástico), propriedades sinérgicas com outros hidrocolóides, como goma guar e LGB (*Locust Bean Gum*), estabilidade à temperatura e compatibilidade com os ingredientes dos alimentos, tendo uma função essencial na textura e estabilidade dos produtos (CARGILL FOODS, 2016; ZHAO et al., 2009; HEMAR et al., 2001).

Em pesquisas científicas, a goma xantana tem sido utilizada como espessante e estabilizante em diferentes preparações, como molho prebiótico para salada (0,35 g xantana/100 g) (MANTZOURIDOU; KAROUSIOTI; KIOSSEOGLU, 2013) e chantilly (0,025-0,125% xantana) (ZHAO et al., 2009). Mirhosseini et al. (2008) otimizaram as quantidades e proporções de goma xantana (0,1-0,3% m/m), goma arábica (7-13% m/m) e

óleo de laranja (6-10% m/m) para elaboração de uma bebida emulsionada de laranja, utilizando a metodologia de superfície de resposta. A formulação com 13,88% m/m de goma arábica, 0,27% m/m de goma xantana e 11,27% m/m de óleo de laranja alcançou os valores ótimos para turbidez, tamanho de partícula, índice de polidispersibilidade e densidade de bebida emulsionada de laranja. De acordo com os autores, bebidas emulsionadas são emulsões do tipo óleo em água (O/A), preparadas na forma concentrada e diluídas em soluções ácidas adicionadas de açúcar, para produzir diferentes tipos de bebidas para consumo, carbonatadas ou não.

3.5 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos ocorrem na natureza como misturas de ésteres, éteres ou ácidos livres (MARQUES; FARAH, 2009). Dividem-se em flavonoides (polifenóis) e não flavonoides (fenóis simples, ácidos fenólicos, taninos e outros) (ARAÚJO, 2011, p.197). Encontram-se amplamente distribuídos em frutas e vegetais e contribuem significativamente tanto para a saúde dos consumidores quanto para a qualidade dos alimentos. Os fenólicos são antioxidantes multifuncionais que podem agir inibindo enzimas oxidativas, quelando metais ou inativando radicais livres (MORALES-DE LA PEÑA, 2011).

A atividade antioxidante dos fenólicos está relacionada com o tipo de composto e sua estrutura química. Os compostos fenólicos apresentam em sua estrutura grupos hidroxila característicos como substituintes de anéis aromáticos. Os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila adjacentes, as duplas ligações do anel e a dupla ligação do carbono com oxigênio de algumas moléculas de flavonoides, conferem aos compostos fenólicos atividade antioxidante (HERNÁNDEZ; PRIETO GONZÁLES, 1999; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes por sua habilidade em doar hidrogênio e elétrons, formando radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, em particular os lipídios. Estes compostos de natureza complexa, amplamente distribuídos em muitos vegetais, frutas e produtos industrializados, podem se apresentar na forma de pigmentos responsáveis pela cor dos alimentos ou como produtos secundários de metabolismo, provenientes de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

A maior classe de compostos fenólicos é a dos ácidos hidroxicinâmicos, que são encontrados em quase todas as plantas. Os ácidos cafeico, ferúlico e p-cumárico, que ocorrem naturalmente na forma livre ou como uma família de mono ou diésteres de ácido quínico, são

coletivamente conhecidos como ácidos clorogênicos. Os ácidos clorogênicos são componentes antioxidantes produzidos pelas plantas em resposta a condições de estresse ambiental, tais como infecções por microrganismos patogênicos, lesões e níveis excessivos de luz, UV ou visível (MARQUES; FARAH, 2009).

Os flavonoides constituem uma grande classe de compostos polifenólicos que, assim como os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos, são encontrados em praticamente todas as plantas (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Estes compostos são sintetizados pelos tecidos das plantas e estão presentes em frutas comestíveis, vegetais folhosos, raízes, tubérculos, bulbos, ervas, temperos, legumes, plantas medicinais, chá, café e vinho em uma variedade de pelo menos 2000 tipos. Podem ser classificados em flavona, isoflavona, flavanona, flavonol, flavanol (catequinas) e antocianinas (HO; RAFI; GHAI, 2010, p.588). Os flavonoides são importantes constituintes dietéticos, em virtude da sua capacidade antioxidante multifuncional, atribuída à sua habilidade em complexar íons metálicos, inativar radicais livres e prevenir a conversão de hidroperóxidos em oxirradicais reativos (OLIVEIRA et al., 2009).

As catequinas do chá verde estão entre os flavonoides mais estudados e seu consumo tem sido associado à redução do risco de doenças cardiovasculares e câncer. A quercetina, flavonol encontrado em chás, vinho, maçã, cebola, entre outros, tem se mostrado um potente antioxidante e agente anti-inflamatório que protege os vasos sanguíneos, as células e suas estruturas dos efeitos destrutivos causados pelos radicais livres. Estudos *in vitro* têm demonstrado que a genisteína, isoflavona da soja, apresenta efeito de inibição de crescimento de vários tipos de células cancerígenas bem como atividade antioxidante. Além dos flavonoides, existem muitos outros compostos polifenólicos encontrados em alimentos, bebidas e extratos de plantas capazes de proporcionar efeitos benéficos à saúde, como a curcumina das raízes tuméricas, o gingerol do gengibre, o resveratrol do vinho tinto e diterpenos fenólicos como o ácido carnósico (HO; RAFI; GHAI, 2010, p.588).

Estudos *in vitro* têm definido o potencial antioxidante dos polifenóis como sequestradores diretos de radicais livres e como agentes capazes de aumentar a resistência à oxidação de lipoproteínas de baixa densidade envolvidas em doenças cardíacas. Os principais constituintes polifenólicos dos alimentos, ou seja, flavonóis como a quercetina e campferol, flavonas como a luteolina, flavanóis como catequinas e antocianidinas como cianidina e malvidina, demonstram maior eficácia como antioxidantes nestes sistemas (em base molar) do que os nutrientes antioxidantes vitamina C, vitamina E e β -caroteno (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

3.6 Radicais Livres e Antioxidantes

Os radicais livres são definidos como espécies químicas que possuem elétrons não pareados no orbital atômico externo. O elétron não pareado é aquele que se encontra sozinho no orbital atômico. A presença de elétrons não pareados torna o radical livre altamente reativo em razão da necessidade de outro elétron para preencher o orbital e se tornar estável. Os radicais livres são menos estáveis e mais reativos que compostos não radicais, mas sua reatividade depende da espécie química. Eles podem reagir entre si, formando ligações covalentes, ou com outras moléculas, doando o elétron não pareado (radical reduzido), recebendo o elétron de outra molécula (radical oxidado) ou sendo adicionado a outras espécies não radicais. O termo “espécies reativas de oxigênio” (EROs) é frequentemente usado para radicais cujo elétron não pareado encontra-se no átomo de oxigênio e também para espécies reativas de oxigênio não radicais (ARAÚJO, 2011, p.21; ARUOMA, 1998). As EROs incluem os radicais livres ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxil ($^{\bullet}OH$), óxido nítrico (NO^{\bullet}) e peroxil (ROO^{\bullet}) e as espécies não radicalares como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$) e ânion hipocloroso (ClO^-) (OLIVEIRA et al., 2009).

Os radicais livres são espécies produzidas durante a respiração aeróbica, como consequência da redução incompleta do oxigênio (MARTINS et al., 2013). Radicais livres e outras EROs podem ser formados por processos físicos ou químicos exógenos ou por processos metabólicos endógenos em sistemas alimentícios ou no corpo humano (GEORGETTI et al., 2008). Diante disso, destaca-se a importância primordial das substâncias antioxidantes, tanto na conservação dos alimentos e preservação da sua qualidade quanto na saúde do consumidor.

EROs são formadas continuamente durante os processos metabólicos por enzimas como a NADPH oxidase, e desempenham um papel duplo no organismo humano, estando envolvidas em processos benéficos e deletérios. Tais espécies atuam como mediadores da transferência de elétrons e em vários processos bioquímicos, como produção de energia, fagocitose (defesa contra agente agressor) e controle do crescimento celular. Normalmente, existe um equilíbrio no organismo entre a formação de EROs e a remoção destas por antioxidantes enzimáticos (glutathione peroxidase e redutase), mantendo um “balanço redox” nas células. No entanto, quando há uma produção excessiva de EROs (decorrentes, por exemplo, da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial ou estimulação excessiva de NADPH), ocorre um desequilíbrio oxidativo ou estresse redox. Quando em concentração

excedente ao normal, essas espécies podem causar danos celulares importantes, ao atacar membranas, proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos (OLIVEIRA et al., 2009; VALKO et al., 2007).

Inúmeras pesquisas têm demonstrado as implicações das reações oxidativas mediadas por espécies reativas em processos degenerativos relacionados com o envelhecimento e sua associação com doenças como câncer, doenças cardiovasculares, hipertensão e patologias neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer) (MARTINS et al., 2013; VALKO et al., 2007; PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000). Por outro lado, estudos epidemiológicos têm mostrado que dietas ricas em frutas e verduras estão associadas a uma menor incidência de doenças crônicas e degenerativas. Um dos principais aspectos relacionados ao efeito protetor desses alimentos tem sido atribuído, em parte, à presença de compostos antioxidantes (OLIVEIRA et al., 2009).

Nos sistemas biológicos, os antioxidantes são substâncias naturais que, presentes em baixas concentrações, protegem os tecidos de danos causados por espécies reativas (OLIVEIRA et al., 2009). O organismo humano possui um sistema de defesa antioxidante de origem endógena (enzimas regulatórias, glutatona e ácido úrico) contra espécies reativas produzidas durante a respiração celular aeróbica e por processos metabólicos. No entanto, este sistema regulatório não é completamente efetivo (MARTINS et al., 2013). Dentre os antioxidantes enzimáticos destacam-se as superóxido dismutases, a catalase e a glutatona peroxidase (OLIVEIRA et al., 2009). Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000) ressaltam que o sistema de defesa antioxidante do organismo pode sofrer uma sobrecarga, devido a uma excessiva geração de pró-oxidantes, resultando em estresse oxidativo. Neste caso, macromoléculas celulares e extracelulares (proteínas, lipídios e ácidos nucléicos) podem sofrer danos oxidativos, causando injúria nos tecidos e afetando a função imune.

Assim, a ingestão de antioxidantes por meio da dieta (vitamina C, tocoferóis, carotenoides e compostos fenólicos) pode ajudar a manter uma adequada capacidade antioxidante, contribuindo com a inativação de espécies reativas e proporcionando um adequado balanço entre antioxidantes e oxidantes no organismo (MARTINS et al., 2013; PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000).

Nos sistemas alimentares, os antioxidantes são compostos que interrompem a reação em cadeia mediada por radicais livres na oxidação de lipídeos, vitaminas, pigmentos e proteínas (antioxidantes primários), que sequestram oxigênio e que complexam íons metálicos (antioxidantes secundários). A oxidação de lipídios está associada à reação dos ácidos graxos

insaturados com oxigênio, por mecanismos químicos e enzimáticos. Os alimentos de origem vegetal e alguns alimentos de origem animal, como as carnes de frango e peixe, possuem lipídios ricos em ácidos graxos altamente insaturados. A degradação oxidativa desses ácidos graxos poli-insaturados é a principal causa de diminuição da vida útil desses alimentos. Nas carnes, a oxidação de ácidos graxos insaturados é acelerada pela mioglobina, devido à presença dos grupos heme (Fe^{++} - oximioglobina) ou hemina (Fe^{+++} - metamioglobina), altamente oxidantes. Reações dessa natureza são frequentemente responsáveis pela rancidez em aves e peixes durante o armazenamento. O cozimento da carne destrói a estrutura heme da mioglobina, acelerando ainda mais as reações de oxidação lipídica e provocando rápido desenvolvimento da rancidez (ARAÚJO, 2011, p.34 e 103).

Os compostos fenólicos são eficientes antioxidantes primários e são os antioxidantes/preservantes de uso mais comum em alimentos (LINDSAY, 2010, p.547). Dentre os antioxidantes fenólicos sintéticos de uso permitido para preservar os alimentos estão o butil-hidroxianisol (BHA), o butil-hidroxitolueno (BHT), o galato de propila e o terc-butil-hidroxiquinona (TBHQ) (OLIVEIRA et al., 2009).

Nos produtos alimentícios, o ácido ascórbico reage rapidamente com o oxigênio, agindo, portanto, como removedor de oxigênio (antioxidante secundário) (ARAÚJO, 2011, p.110). Evidências indicam que o ácido ascórbico pode, também, regenerar antioxidantes fenólicos pelo fornecimento de átomos de hidrogênio aos radicais fenoxil, os quais se formam quando os antioxidantes fenólicos cedem átomos de hidrogênio para interromper a reação em cadeia da oxidação de lipídeos, tendo o ácido ascórbico um efeito sinérgico sobre os fenólicos (LINDSAY, 2010, p.547; ALLEN; HAMILTON, 1994).

Os metais, como cobre e ferro, agem como catalisadores da reação de oxidação de lipídeos. Estes pró-oxidantes metálicos podem ser inativados pela adição de agentes quelantes ou complexantes, como o ácido cítrico e o EDTA (antioxidantes secundários), que também apresentam efeito sinérgico por aumentarem a efetividade dos antioxidantes fenólicos na prevenção da oxidação lipídica (LINDSAY, 2010, p.547; ALLEN; HAMILTON, 1994).

No alimento, a complexidade do processamento associada à necessidade de aumentar o período de armazenamento, torna o produto vulnerável à deterioração oxidativa de lipídios, vitaminas e pigmentos. Portanto, a utilização de substâncias químicas capazes de oferecer proteção contra a oxidação faz-se necessária. A inibição completa da oxidação de lipídeos não é possível, mas algumas medidas são capazes de retardar a oxidação por meses, entre elas a utilização de embalagem apropriada, o emprego de atmosfera inerte e condições adequadas de

armazenamento, bem como a utilização de antioxidantes, preservando, assim, carotenoides, vitaminas lipossolúveis (A e D) e ácidos graxos insaturados (ARAÚJO, 2011, p.103).

No entanto, o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade. Diante disso, a busca por métodos alternativos para retardar processos oxidativos em produtos alimentícios tem motivado as pesquisas com compostos naturais, que apresentem esta propriedade funcional (LUZIA; JORGE, 2010). Muitas substâncias de origem natural possuem atividade antioxidante, como é o caso dos tocoferóis, vitamin C, β -caroteno e dos extratos contendo substâncias polifenólicas (LINDSAY, 2010, p.547; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Em vários estudos têm sido investigada a capacidade antioxidante de extratos de plantas como capim-limão (FIGUEIRINHA et al., 2008, MORAES-DE-SOUZA et al., 2008) e de outras plantas medicinais de uso popular (DALAR; KONCZAK, 2013) (capacidade antioxidante *in vitro*), de marcela (CAMPAGNOL et al., 2011), alecrim e melissa (LARA et al., 2011) (prevenção da oxidação lipídica em produtos cárneos); de extratos de grãos e sementes, como semente de limão (prevenção da oxidação lipídica em óleo de soja) (LUZIA; JORGE, 2009) e semente de uva (capacidade antioxidante *in vitro*) (ADÁMEZ et al., 2012); de extratos de frutas como araçá (MEDINA et al., 2011) e caqui (MILANI et al., 2012) (capacidade antioxidante *in vitro*); e de óleos essenciais como de cebola (capacidade antioxidante *in vitro*) (YE; DAI; HU, 2013) e de espécies de *Croton* (inibição da peroxidação lipídica induzida em gema de ovo) (MORAIS et al., 2006).

3.6.1 Métodos para Determinação da Capacidade Antioxidante

Devido à importância dos antioxidantes, vários testes químicos têm sido propostos para avaliar a capacidade antioxidante de alimentos e outros substratos (MARTINS et al. 2013; PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000). Estes ensaios diferem em relação ao mecanismo de reação, às espécies-alvo, às condições reacionais e na forma como os resultados são expressos (OLIVEIRA et al., 2009). De acordo com MARTINS et al. (2013), os principais testes de determinação da capacidade antioxidante *in vitro* incluem: o método de Folin-Ciocalteu, que é utilizado para determinar o teor de compostos fenólicos totais (apresentam correlação com a capacidade antioxidante), os métodos ABTS e DPPH, que avaliam a capacidade antioxidante a partir da inibição de radicais livres, e o método FRAP, no qual a capacidade antioxidante é avaliada a partir da redução de íons férrico.

O método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Swain e Hillis (1959), utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu que consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstíco, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Em presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$, nos quais o estado de oxidação do molibdênio é (V) (cor azul), cuja coloração absorve a radiação eletromagnética a 765 nm, permitindo a determinação da concentração de compostos fenólicos totais (OLIVEIRA et al., 2009).

Um dos métodos mais usados para verificar a capacidade antioxidante é o método DPPH que, conforme descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), consiste em avaliar a atividade redutora do antioxidante em relação ao radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), monitorando o decréscimo na absorbância durante a reação, a um comprimento de onda característico. O radical DPPH•, que apresenta coloração púrpura e absorve a radiação eletromagnética a 515 nm, é reduzido quando reage com um antioxidante doador de hidrogênio (fenólicos, vitamina C) formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância. Quanto menor é a absorbância da mistura reacional, maior é a capacidade antioxidante da amostra (COSTA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2009). Apesar de ser um teste simples, rápido e amplamente utilizado, a interpretação é complicada quando os compostos em teste apresentam espectros que se sobrepõem ao DPPH a 515 nm. Os carotenóides, em particular, interferem na análise (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

O método ABTS foi inicialmente descrito por Miller et al. (1993) e é baseado na capacidade dos antioxidantes em sequestrar o radical catiônico ABTS^{*+} . Este radical não está disponível comercialmente, precisando ser gerado previamente ao ensaio, por meio de uma reação química. Para tanto, o ABTS (2,2'-azinobis-3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid) é oxidado por radicais peróxil ou outro oxidante, formando o radical catiônico de longa vida ABTS^{*+} , que apresenta coloração intensa. A atividade antioxidante é determinada a partir da capacidade dos compostos em reagir diretamente com o radical ABTS^{*+} , diminuindo a intensidade da cor (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005) e da absorbância da mistura reacional a 730 nm (SÁNCHEZ-GONZÁLES; JIMÉNEZ-ESCRIG; SAURA-CALIXTO, 2005). Esta reação é termodinamicamente possível quando o composto apresenta potencial redox menor que o ABTS^{*+} (0,68 V), como é o caso de certos compostos fenólicos (AWIKA et al., 2003).

A capacidade antioxidante determinada por ambos os métodos, DPPH e ABTS, pode ser expressa como TEAC (*Trolox equivalent antioxidant activity*). O TEAC é definido como a concentração da solução de Trolox (análogo à vitamina E solúvel em água) com potencial antioxidante equivalente a uma solução 1 mM do composto sob investigação (RICE–EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) foi originalmente desenvolvido por Benzie e Strain (1996) para medir a atividade antioxidante do plasma, por meio da sua capacidade redutora, mas o método tem sido subsequentemente adaptado e utilizado para outros substratos como chá, vinho e extratos botânicos (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000). No método FRAP, a capacidade antioxidante é determinada a partir de uma reação redox que ocorre entre o substrato (doador de elétrons) e o íon Fe^{+3} (receptor de elétrons), formando íons Fe^{+2} . Esta redução é monitorada espectrofotometricamente pela mudança na cor da solução de Fe^{+3} com TPTZ (2,4,6-tris(2pyridyl)-s-triazine), que se torna azul e absorve a radiação eletromagnética a 595 nm (MARTINS et al., 2013).

O FRAP detecta compostos com potencial redox $< 0,7$ V, que é o potencial redox do complexo Fe^{3+} - TPTZ. O potencial redutor parece estar relacionado com o grau de hidroxilação e extensão da conjugação em polifenóis. O FRAP não é capaz de detectar compostos que inativam radicais pelo mecanismo de transferência de hidrogênio. Como o potencial redox do Fe^{3+} - TPTZ é comparável ao do ABTS $^{•+}$ (0.68 V), compostos semelhantes reagem em ambos os testes, ABTS e FRAP. No entanto, as condições reacionais são diferentes. Enquanto o TEAC é realizado em pH neutro, o FRAP é conduzido em pH ácido (3,6) para manter a solubilidade do ferro. Em pH ácido, diminui o potencial de ionização que impulsiona a transferência de elétrons e aumenta o potencial redox, causando uma mudança no mecanismo de reação dominante. Assim, embora os dois testes possam resultar em capacidades antioxidantes comparáveis, os valores obtidos no FRAP são geralmente menores que os valores fornecidos pelo TEAC (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Alguns outros métodos químicos frequentemente empregados avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica por meio da quantificação dos produtos da reação como dienos conjugados, peróxidos lipídicos ou hidroperóxidos, bem como dos produtos resultantes da decomposição dos peróxidos lipídicos, como os malonaldeídos determinados pelo teste de TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) ou pela determinação do percentual de inibição da oxidação dos lipídios do sistema pelo antioxidante a ser testado (OLIVEIRA et al., 2009; PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000).

Apesar da diversidade de métodos para avaliar a capacidade antioxidante, não existe um procedimento metodológico universal (OLIVEIRA et al., 2009). Antioxidantes individuais podem agir por múltiplos mecanismos em um único sistema ou por um único mecanismo que varia de acordo com o sistema de reação. Além disso, os antioxidantes podem responder de forma diferente a diferentes fontes de radicais. Como múltiplas reações e mecanismos estão geralmente envolvidos, um único ensaio não é capaz de representar com precisão todos os radicais ou antioxidantes em um sistema misto ou complexo (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Este fato impõe a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diferentes testes, com fundamentos e mecanismos de ação diferentes. No entanto, deve-se ressaltar que a comparação da capacidade antioxidante entre os diferentes métodos não é feita em valores absolutos, uma vez que cada método tem sua própria escala de valores (OLIVEIRA et al., 2009).

Os testes que avaliam a capacidade antioxidante *in vitro* (Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS etc.) determinam o potencial antioxidante global do extrato em análise, indicando possíveis efeitos benéficos para saúde do consumidor, resultantes da prevenção de reações oxidativas no organismo humano, bem como possibilidades de uso como antioxidante natural em produtos alimentícios (ADÁMEZ et al., 2012). Já os ensaios que avaliam a capacidade antioxidante pela inibição da oxidação/peroxidação lipídica no alimento são aplicados mais especificamente para determinar o efeito do extrato na conservação dos produtos alimentícios (CAMPAGNOL et al., 2011; LARA et al., 2011; LUZIA; JORGE, 2009).

Uma vez determinadas a presença de compostos bioativos bem como as propriedades antioxidantes de determinado extrato, alimento ou bebida, com potenciais efeitos benéficos para a saúde do consumidor, este somente se constituirá em uma fonte viável de compostos bioativos e antioxidantes se apresentar qualidade sensorial e boa aceitação. Inúmeras pesquisas tem evidenciado que os aspectos sensoriais de sabor, aroma, aparência e textura influenciam na aceitação de alimentos e bebidas (PIMENTEL; MADRONA; PRUDENCIO, 2015; CADENA et al., 2013; DE PAULA et al., 2011; TERHAAG, 2011; BEHRENS; DA SILVA, 2004). Assim, entende-se que o desenvolvimento de alimentos e bebidas bioativos deverá contemplar, concomitantemente, a avaliação da capacidade antioxidante, a análise do perfil sensorial descritivo e o teste de aceitação de atributos.

3.7 Sucos e Bebidas Mistas Prontas para Consumo

A demanda crescente de sucos de frutas de alta qualidade sensorial e nutricional, nas últimas décadas, tem levado a indústria mundial de alimentos a desenvolver uma grande variedade de sucos de frutas e de bebidas mistas com sucos de frutas, concentrados ou prontos para o consumo. Os sucos de frutas e as bebidas mistas com sucos de frutas são considerados uma boa fonte de compostos bioativos (vitamina C e fenólicos), que apresentam atividade antioxidante e contribuem para a saúde dos consumidores. As bebidas mistas com soja podem conter, ainda, quantidades consideráveis de isoflavonas. O consumo de bebidas mistas com suco de frutas e extrato de soja cresceu 30% na Europa na última década (MORALES-DE LA PEÑA, 2011).

De acordo com a legislação Brasileira (BRASIL, 2013), a bebida mista é um tipo de bebida não alcoólica que contém dois ou mais ingredientes característicos, que podem ser uma combinação de sucos de frutas, polpa de frutas, vegetais e extratos. Por sua vez, concentrado líquido para bebida mista é a preparação que contém ingredientes característicos como suco ou polpa de frutas e extratos vegetais, açúcar e água, e pode conter, como ingredientes opcionais, outros derivados naturais de frutas ou vegetais na forma de óleos essenciais e extratos, sendo necessário apenas diluir em água antes do consumo. Ainda, o concentrado deve ser preparado por meio de processo tecnológico e ser preservado física ou quimicamente até o momento do uso (BRASIL, 1998).

O consumo de bebidas não alcoólicas no Brasil teve um crescimento de 0,3% entre 2012 e 2013, com destaque para os sucos prontos que registraram um aumento de 12,5% no período. Dados da consultoria Nielsen (2014) mostram que foram vendidos no País 367,6 milhões de litros de suco só no primeiro semestre de 2013. Neste mesmo ano, a categoria de sucos prontos conquistou mais de 1,7 milhões de novos domicílios consumidores, predominantemente do Sul e Sudeste do país, em lares com nível socioeconômico médio. De acordo com dados da Associação Brasileira de Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não Alcoólicas (ABIR, 2014), de 2013 para 2014 houve um aumento de 14% no volume de sucos prontos consumidos, totalizando 6,4 L per capita por ano.

O apelo saudável dos produtos e a busca das pessoas por praticidade foram responsáveis pelo crescimento no consumo de sucos prontos no Brasil (ESTADÃO PME, 2013). No ano de 2013 foram lançados 343 novos sucos no mercado brasileiro, sendo que o néctar de fruta foi o que teve o maior número de lançamento, seguido por suco à base de frutas em segundo lugar e suco integral na terceira colocação. A caixa cartonada foi a

embalagem mais utilizada para envasar os sucos no período (superior a 50%), seguida por garrafa de plástico e vidro (em torno de 35%), lata (menos de 10%) e copos (menos de 5%) (ABRE, 2014).

Segundo reportagem do jornal Estadão PME (pequenas e médias empresas) (2013), o mercado de suco pronto é consolidado nas classes mais altas e, para conquistar este nicho de mercado, é preciso buscar algo diferente com apelo saudável. Ainda assim, as classes média e baixa têm alavancado o crescimento da categoria, pois o consumo que antes era esporádico tornou-se mais frequente. De acordo com o Sebrae (2015), o mercado de produtos alimentícios ligados à saúde e bem-estar cresceu 98% no Brasil no período de 2009 a 2014, sendo que 28% dos brasileiros considera muito importante consumir produtos nutricionalmente ricos e 22% da população opta por comprar produtos naturais e sem conservantes, indicando que o consumidor está mais exigente e atento à qualidade dos produtos. Pesquisa da Nielsen (2016) enfatiza que a atual crise econômica do país não afetou a categoria de bebidas com apelo saudável, como sucos e chás prontos, cujo consumo continua crescendo.

Na categoria de sucos prontos para consumo estão incluídas as bebidas mistas com soja, as quais ocupam uma fração importante deste mercado. As bebidas com soja constituem uma alternativa alimentar saudável, sem lactose e gorduras saturadas, e podem ser elaboradas utilizando-se tanto o extrato de soja como o isolado proteico de soja. O extrato de soja, popularmente conhecido como “leite de soja”, era consumido inicialmente apenas por pessoas com intolerância à lactose, vegetarianos ou indivíduos com restrições alimentares. No entanto, a nova geração de bebidas mistas com soja, adicionadas de sucos de frutas, saborizadas e aromatizadas, tornou-se atrativa para a população em geral, alavancando o crescimento do consumo deste tipo de bebidas na última década, tanto no Brasil quanto no mundo (BENASSI; BENASSI; MANDARINO, 2012; CALLOU, 2009).

Apesar do bom desempenho comercial das bebidas de soja e do fato de se constituírem em uma opção para incluir as isoflavonas na dieta, proporcionando, assim, benefícios para a saúde (CALLOU, 2009), verifica-se ainda a necessidade do desenvolvimento de produtos que atendam melhor as expectativas do consumidor (TERHAAG, 2011). Apesar de ocorrer a adição de aromatizantes, o sabor característico da soja não é totalmente mascarado, sendo uma das principais causas de rejeição das bebidas de soja pelos consumidores (POTTER et al., 2007).

No mercado brasileiro, existem, atualmente, algumas opções de bebidas mistas prontas para consumo contendo sucos de frutas (limão, tangerina, frutas vermelhas, pêssigo etc) e chá

(branco, verde ou preto) ou sucos de frutas e ervas, como abacaxi com hortelã, bem como uma grande variedade de bebidas mistas com sucos de frutas e soja. No entanto, até o momento, não existem bebidas mistas com suco de limão e capim-limão, seja com ou sem adição de soja. Outro aspecto inovador desta pesquisa é a utilização de derivados de capim-limão na elaboração de bebidas mistas, ao invés do chá, destacando-se a adição de emulsão de óleo essencial de capim-limão.

4. REFERÊNCIAS

- ABIR. Associação Brasileira de Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não Alcoólicas. **Dados** (2014). Disponível em: <http://abir.org.br/o-setor/dados/>. Acesso em: 24/08/2016.
- ABRE. Associação Brasileira de Embalagem. **Consumo de sucos prontos cresce 12,5% em um ano**. Online News: 31/03/2014. Disponível em: <http://www.abre.org.br/noticias/consumo-de-sucos-prontos-cresce-125-em-um-ano/>. Acesso em: 24/08/2016.
- ADÁMEZ, J.D. et al. In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). **Food Control**, n.24, p.136-141, 2012.
- ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. **Rancidity in Foods**. 3rd ed. Glasgow: Chapman & Hall, London, UK. 1994. 290p.
- ALMEIDA, T.S. et al. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products**, n.44, p. 630 - 633, 2013.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: Teoria e prática**. 5^a ed., Viçosa: Editora UFV, 2011. 601p.
- ARUOMA, O.I. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.75, n.2, p.199-212, 1998.
- AWIKA, J.M. et al. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, n.23, p.6657- 6662, 2003.
- BARBOSA, A.C.L. et al. Isoflavone content and profile and antioxidant activity of soy and soy products. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.26, n.4, p.921-926, 2006.
- BATISTA, E.A. **Caracterização da produção e comercialização da lima ácida Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka) no município de Cruz das Almas no Estado da Bahia**. 2010. 59f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA.
- BEHRENS, J.H.; DA SILVA, M.A.A.P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 431-439, jul.-set. 2004.
- BEMILLER, J.N.; HUBER, K.C. Carboidratos. In: DAMODARAM, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 119-121

BENASSI, V.T.; BENASSI, M.T.; MANDARINO, J.M.G. Sensory acceptance of soymilk from 13 Embrapa Soja soybean cultivars. **VI Congresso Brasileiro de soja**, Cuiabá, MT, 2012.

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Xanthan Gum: characteristics and operational conditions of production. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 171-188, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, n.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. (1998). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade de refresco, refrigerante, preparado ou concentrado líquido para refresco ou refrigerante, preparado sólido para refresco, xarope e chá pronto para o consumo. Portaria N. 544.

BRASIL. (2002). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Resolução RDC n.2, de 07 de janeiro de 2002.

BRASIL. (2013). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Complementa os padrões de identidade e qualidade das seguintes bebidas: Refresco, refrigerante, bebida composta, chá pronto para consumo e soda. Instrução Normativa Nº 19, de 19 de junho de 2013.

BRASIL. (2016). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Atualizado em 14/03/2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>

BREMER NETO, H. et al. Caracterização tecnológica e aptidão mercadológica de clones de lima ácida ‘Tahiti’. In: Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura, n. 21, 2010, Natal, RN.

CADENA, R.S. et al. Sensory profile and physicochemical characteristics of mango nectar sweetened with high intensity sweeteners throughout storage time. **Food Research International**, v. 54, p. 1670–1679, 2013.

CALLOU, K.R.A. **Teor de isoflavonas e capacidade antioxidante de bebidas à base de soja**. 2009. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CAMPAGNOL, P.C.B. et al. The influence of achyrocline satureioides (“Marcela”) extract on the lipid oxidation of salami. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n.1, p. 101-105, 2011.

CARGILL FOODS. (2016). **Hidrocolóides: Goma Xantana**. Disponível em: <http://www.cargillfoods.com/lat/pt/produtos/hidrocoloides/goma-xantana/index.jsp>. Acesso em: 22/08/2016.

COSTA, A.S.G. et al. Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, p.324-328, 2012.

COSTA, L.C.B. et al. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.956-959, 2005.

DALAR, A.; KONCZAK, I. Phenolic contents, antioxidant capacities and inhibitory activities against key metabolic syndrome relevant enzymes of herbal teas from Eastern Anatolia. **Industrial Crops and Products**, n.44, p. 383– 390, 2013.

DE PAULA, et al. Aceitabilidade de mandioca e feijão biofortificados. In: Anais IV COMAN – I CONAN, Ed. UFOP, Universidade Federal de Ouro Preto – MG, p. 13-18, 2011.

DURIGAN, M.F.B.; MATTIUZ, B.H.; DURIGAN, J.F. Injúrias mecânicas na qualidade pós-colheita de lima ácida ‘Tahiti’ armazenada sob condição ambiente. **Rev. Bras. Frutic.**, v.27, n.3, p.369-372, 2005.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Lima Ácida - Tahiti CNPMF 5059**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/664/lima-acida---tahiti-cnpmf-5059>. Acesso em: 25/08/2016.

ESTADÃO PME - Pequenas e Médias Empresas. **Empreendedores apostam no suco pronto saudável e (muito) lucrativo**. Negócios: 30 de outubro de 2013. Disponível em: <http://pme.estadao.com.br/noticias/noticias,empreendedores-apostam-no-suco-pronto-saudavel-e-muito-lucrativo,3589,0.htm> . Acesso em: 22/08/2016.

ESTEVES, E.A.; MONTEIRO, J.B.R. Beneficial effects of soy isoflavones on chronic diseases. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.14, n.1, p.43-52, 2001.

FDA. (2016). U.S. Food and Drug Administration. FDA Statement Regarding Soy Protein and Coronary Heart Disease Health Claim Review. Atualizado em 30 de junho de 2016. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/labelingnutrition/ucm509239.htm>

FIGUEIRINHA, A. et al. Cymbopogon citratus leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. **Food Chemistry**, n.110, p.718–728, 2008.

GEORGETTI, S.R. et al. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, 41, p.1521–1527, 2008.

GÓES-FAVONI, S.P.et al. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.24, n.4, p.582-586, 2004.

HEMAR, Y. et al. Viscosity, microstructure and phase behavior of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, n.15, p.565-574, 2001.

HERNÁNDEZ, A.M.; PRIETO GONZÁLES, E.A. Plantas que contienen polifenoles. **Revista Cubana de Investigaciones Biomedica**, Ciudad de La Habana, v.18, n.1, p.12-14, 1999.

- HO, C.T; RAFI, M.M.; GHAI, G. Substâncias Bioativas: Nutracêuticas e Tóxicas. In: DAMODARAM, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 585-593
- JOMORI, M.L.L. et al. Conservação refrigerada de lima ácida 'Tahiti': Uso de 1-metilciclopropeno, ácido giberélico e cera. **Rev. Bras. Frutic.**, v.25, n.3, p.406-409, 2003.
- LARA, M.S. Evaluation of two natural extracts (*Rosmarinus officinalis* L. and *Melissa officinalis* L.) as antioxidants in cooked pork patties packed in MAP. **Meat Science**, n.88, p.481– 488, 2011.
- LIMA, F.S.; IDA, E.I. Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones. **LWT - Food Science and Technology**, v.56, p.232-239. 2014.
- LINDSAY, R. C. Aditivos alimentares. In: DAMODARAM, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 547-548
- LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Atividade Antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p.946-949, 2009.
- MANTZOURIDOU, F.; KAROUSIOTI, A.; KIOSSEOGLOU, V. Formulation optimization of a potentially prebiotic low-in-oil oat-based salad dressing to improve *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* survival and physicochemical characteristics. **LWT - Food Science and Technology**, n.53, p.560-568, 2013.
- MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, n.113, p.1370–1376, 2009.
- MARTINAZZO A.P. et al. Modelagem matemática e parâmetros qualitativos da secagem de folhas de capim-limão [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf]. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.12, n.4, p.488-498, 2010.
- MARTINS, A.C. et al. The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: Optimising the conditions using the response surface methodology. **Food Chemistry**, n.138, p.574–580, 2013.
- MEDINA, A. L. Araçá (*Psidium cattleianum*Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, n.128, p. 916–922, 2011.
- MESSINA, M.; LANE, B. Soy protein, soybean isoflavones and coronary heart disease risk: where do we stand? **Future Lipidology**, v.2, n.1, p.55-74, 2007.
- MILANI, L. I. G. et al. In vitro antioxidant and antimicrobial properties of persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Rama Forte) extracts. **Braz. J. Food Technol**, Campinas, v.15, n.2, p.118-124, 2012.
- MILLER, N. J. et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin. Sci.**, v. 84, p.407-412, 1993.

MIRHOSSEINI, H. et al. Optimization of the contents of Arabic gum, xanthan gum and orange oil affecting turbidity, average particle size, polydispersity index and density in orange beverage emulsion. **Food Hydrocolloids**, n.22, p.1212-1223, 2008.

MORAES-DE-SOUZA, R.A. et al. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. **Cienc. Tecnol. Aliment.** v. 6, n. 1, p. 41-47, 2008.

MORAIS, S. M. et al. Antioxidant activity of essential oils from northeastern Brazilian croton species. **Quim. Nova**, v.29, n.5, p.907-910, 2006.

MORALES-DE LA PEÑA, M. et al. Changes on phenolic and carotenoid composition of high intensity pulsed electric field and thermally treated fruit juice–soymilk beverages during refrigerated storage. **Food Chemistry**, n.129, p.982–990, 2011.

MURPHY, P.A. Soybean Proteins. In: JOHNSON, L.A.; WHITE, P.J.; GALLOWAY, R. (eds.). **Soybeans: Chemistry, Production, Processing and Utilization**. Urbana: AOCS Press, Illinois. 2008. p. 229-268

NIELSEN. (2014). **Suco pronto conquista 1,7 milhões de novos lares brasileiros**. Consumo: 03 de fev de 2014. Disponível em: <http://www.nielsen.com/br/pt/nielsen-pressroom/2014/suco-pronto-conquista-mais-de-1-milhao-de-novos-lares-brasileiros.html>. Acesso em 25/08/2016.

NIELSEN. (2016). **4 Fatores essenciais que movem o mercado de bebidas**. Consumo: 12 de jul de 2016. Disponível em: <http://www.nielsen.com/br/pt/press-room/2016/4-fatores-essenciais-que-movem-o-mercado-de-bebidas.html>. Acesso em: 25/08/2016.

OLIVEIRA, A.C.G. et al. Effects of heat treatment and gamma radiation on the characteristics of pure sugarcane juice and mixed with fruit juices. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.4, p.863-873, 2007.

OLIVEIRA, A.C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 3, p.689-702, 2009.

PEDRÃO, M. R. et al. Estabilidade físico-química e sensorial do suco de limão Tahiti natural e adoçado, congelado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.2, Campinas, p.282-286, 1999.

PIMENTEL, T.C.P.; MADRONA, G.S.; PRUDENCIO, S.H. Probiotic clarified apple juice with oligofructose or sucralose as sugar substitutes: Sensory profile and acceptability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 838-846, 2015.

POTTER, R.M. et al. Characteristics of wild blueberry-soy beverages. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, n. 5, p.807-814, 2007.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, A. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, p.4290–4302, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.3396 –3402, 2000.

- REBEQUI, A.M. et al. Production of rangpur lemon seedlings in substrate with bovine biofertilizer irrigated with saline water. **Revista de Ciências Agrárias**, v.32, n.2, p.219-228, 2009.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.20, n.7, p.933-956, 1996.
- SÁNCHEZ-GONZÁLES, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffee brewed using diferente procedures (Italian, Espresso and Filter). **Food Chemistry**, v.90, p.133-139, 2005.
- SANTOS, B.S. et al. Obtention, freeze-drying and characterization of lemon grass (*Cymbopogon citratus* D.C.) and hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts. In: IV Simpósio Internacional de Inovação Tecnológica. 2013. **Anais SIMTEC**, Aracaju, SE, 25 a 27/09/2013, v. 1, n. 1, p. 366-375.
- SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Consumo**. 2015. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/segmento-de-alimentacao-saudavel-apresenta-oportunidades-de-negocio,f48da82a39bbe410VgnVCM1000003b74010aRCRD>. Acesso em: 25/08/2016.
- SILVA, M.A.L. et al. Avaliação da composição química de *Cymbopogon citratus* Stapf cultivado em ambientes com diferentes níveis de poluição e a influência na composição do chá. **Acta Scientiarum**. Health Sciences. Maringá, v.32, n.1, p.67-72, 2010.
- SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* – the quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, p.63-68, 1959.
- TERHAAG, M.M. **Caracterização sensorial de bebidas de soja sabor original: análise descritiva e estudo de consumidor**. 2011. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.
- VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.
- YE, C.L.; DAI, D.H.; HU, W.L. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.). **Food Control**, n. 30, p. 48-53, 2013.
- ZHAO, Q. et al. Effect of xanthan gum on the physical properties and textural characteristics of whipped cream. **Food Chemistry**, n.116, p.624–628, 2009.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos empregados no desenvolvimento deste trabalho de pesquisa estão descritos no corpo dos quatro artigos científicos redigidos, sendo que cada artigo corresponde a uma etapa da pesquisa.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no decorrer das quatro etapas da pesquisa desenvolvida são apresentados a seguir, na forma de quatro artigos científicos.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Development of Concentrates for the Preparation of Lemongrass-Lime Mixed Beverage: Physicochemical, Antioxidant and Sensory Properties

Dirlei D. Kieling and Sandra H. Prudencio*

Food Science and Technology Department, State University of Londrina, Londrina, PR, 86057-970, Brazil. *Corresponding author: sandrah@uel.br Tel./fax: +55 43 3371 4080

ABSTRACT

This study aimed to develop concentrates with lemongrass derivatives (aqueous extract, lyophilized extract and essential oil) and lime juice for the preparation of lemongrass-lime mixed beverages. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of the concentrates, the sensory profile and acceptance of the mixed beverages were determined. The concentrates formulated presented bioactive compounds (phenolics and vitamin C) and antioxidant properties. Mixed beverages prepared from concentrates containing aqueous extract or lyophilized extract plus essential oil showed higher intensity of lemongrass aroma and flavor and were more readily accepted. The concentrates lead to lemongrass-lime mixed beverages sensory pleasant and potentially beneficial to the consumer's health.

Keywords: *Cymbopogon citratus*, beverages, bioactive compounds, antioxidants, sensory profile, acceptance.

1. Introduction

Lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) is an aromatic plant popularly known and used as a medicinal tea, but its greatest economic significance lies in the essential oil production (COSTA et al., 2005; FIGUEIRINHA et al., 2008; SILVA et al., 2010). Many of the health benefits provided by medicinal plants have been attributed to phenolic compounds. The main class of phenolic compounds found in plants is the hydroxycinnamic acids. In this class are the phenolic acids that occur naturally in their free forms or as a family of mono or diesters with quinic acid, collectively known as chlorogenic acids, which are associated with potential benefits, such as antioxidant, hypoglycemic and hepatoprotective properties (MARQUES; FARAH, 2009).

Phenolic compounds with antioxidant properties were found in equivalent amounts in the aqueous extract and in the methanol extract of lemongrass (FIGUEIRINHA et al., 2008; MARQUES; FARAH, 2009). The presence of polyphenols was also identified in tea as well as in the extracts of dried leaves of lemongrass (SILVA et al., 2010). The essential oil found in lemongrass leaves consists mainly of citral (65-86%), responsible for lemon flavor, and secondary metabolites such as chlorogenic acid, limonene and menthol (SILVA et al., 2010). According to Raut and Karuppaiyl (2014), citral possesses antimicrobial and cancer preventing properties. Although lemongrass essential oil is widely used by the cosmetics and fragrance industries (COSTA et al., 2005), there is no scientific evidence relative to its application in beverages.

Lime juice is also a source of antioxidants, such as phenolic acids, flavonoids, and vitamin C (LUZIA; JORGE, 2009). In addition, it confers on the product to which it is added a refreshing and pleasing flavor (OLIVEIRA et al., 2007). The Tahiti lime (*Citrus latifolia* Tanaka) is one of the largest citrus fruits of commercial relevance. Since it has no off-season, it is available in the market year-round, and is widely used in the preparation of beverages as well as in the production of juice concentrates (MENDONÇA et al., 2006).

Although practicality is important to modern consumers, they also seek products that are healthful and sensorially pleasant. Aware of this trend, the industry has developed a wide variety of mixed beverages, associating fruit juices with white, green and black tea, herbs such as mint, and others. However, the market still does not offer mixed beverages with lemongrass and lime juice. The literature also reports no studies on concentrate or mixed beverage of lemongrass and lime and there is no information about the characteristics of these products.

In Brazil, liquid concentrate for mixed beverage is a preparation containing characteristic ingredients such as juices or fruit pulp and vegetable extracts, sucrose and water, and might contain, as optional ingredients, other natural raw material from fruit or vegetables in the form of essential oils and extracts, requiring simple dilution in water prior to consumption. In addition, the concentrate should be prepared by means of a technological process and preserved physically or chemically until be used (BRASIL, 1998).

The pleasing sensory characteristics of lemongrass such as aroma, flavor and freshness, and the beneficial aspects attributed to the presence of bioactive compounds, indicate that this raw material may have a potential for use in beverages. Additionally, the combination of lemongrass with lime juice can improve the sensory characteristics and complement the beneficial aspects of the mixed beverage. Thus, this study aimed to develop

lemongrass-lime concentrates for the preparation of mixed beverages, determining the physicochemical characteristics and antioxidant properties of the concentrates as well as the sensory profile and acceptance of the mixed beverages.

2. Material and Methods

2.1 Material

The lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) was grown at the State University of Londrina (Londrina, Paraná, Brazil), with geographic coordinates of 23°19'42'' S and 51°12'15'' W, and harvested after 60 days of cultivation. Fresh Tahiti lime fruit, xanthan gum and sucrose were obtained from reliable commercial sources. All reagents used in the analysis were of analytical grade. Gallic acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 2 N, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), ABTS (2,2'-azinobis-3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid) and DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

The research was approved by the Ethics Committee for Research Involving Human Beings of the State University of Londrina (CEP/UEL N. 235/2013 and CAAE N. 24537713.0.0000.5231). All procedures were performed according to the principles of good manufacturing practices (BRASIL, 1997) and food safety (CODEX ALIMENTARIUS, 2003), and both the concentrates and the mixed beverages were safe for consumption.

2.2 Lemongrass Derivatives

First, fresh leaves of lemongrass were washed in running water and immersed in chlorine solution (150 mg.L^{-1}) for 15 minutes. Next, the leaves were rinsed in purified water, drained and left to dry on paper towels for 30 minutes. The edges of the leaves (tip and stem) were removed and discarded and the middle portion was cut into 1 cm pieces. The fragmented leaves were processed in blender with purified water at a 1:4 ratio (m:v), filtered through tulle, and the residue was manually compressed to remove all liquid. The resulting filtrate was called "lemongrass aqueous extract" (LAE). Portions of LAE were lyophilized (Christ Alpha 2-4 Lyophilizer LD plus, Osterode, Germany) to obtain the "lemongrass lyophilized extract" (LLE), which was ground to powder. LLE in powder form was packed in laminated vacuum packaging and stored at $-18 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$. "Lemongrass essential oil" (LEO) was extracted from

the fragmented leaves by hydro-distillation method for 2 h (ALMEIDA et al., 2013). The LEO obtained was packed in amber bottle and stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3 Lemongrass Essential Oil Emulsion

The “lemongrass essential oil emulsion” (LEOE) was prepared with lemongrass essential oil, xanthan gum and water (1:1:48 g:g:mL) using a Ultra-Turrax® (IKA®, Staufen, Germany), according to Mirhosseini et al. (2008) recommendations, with some modifications. The LEOE obtained was packaged in an amber bottle and stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4 Tahiti Lime Juice

Fresh fruits of Tahiti lime were washed in running water, immersed in chlorine solution (150 mg.L^{-1}) for 15 minutes and rinsed in purified water. It was then weighed, cut into halves and the juice extracted using an electrical extractor. The solid particles were then separated out utilizing tulle. The “Tahiti lime juice” (TLJ) obtained was weighed and immediately used in the formulation of the concentrates. The percentage yield of juice was determined according to Equation (1).

$$\text{Yield (\%)} = [\text{Weight of the obtained juice (g)} / \text{Weight of whole limes (g)}] \times 100 \quad (1)$$

2.5 Formulations of Concentrates

Three formulations of liquid concentrates with lemongrass derivatives and Tahiti lime (F1, F2 and F3) and one control without lemongrass derivatives (F0) were prepared, in appropriate amount to prepare 1000 mL of mixed beverage (Table 1).

Table 1 - Formulations of liquid concentrates.

Formulation	LAE	LLE	LEOE	TLJ	Sucrose
F0	-	-	-	90 g	80 g
F1	25 mL	-	-	90 g	80 g
F2	-	0.26 g	-	90 g	80 g
F3	-	0.26 g	1.25 g	90 g	80 g

The amount of TLJ was determined on the basis of a preliminary study (PEDRÃO et al., 1999), with some modifications, and the amount of LAE added was based on previous sensory tests. Concentrates of LAE and TLJ and different amounts of sucrose were then prepared. Mixed beverages with varying levels of sweetness were prepared by simple dilution

of concentrates in purified water, and subjected to Rank preference test with 60 panelists as described by Meilgaard, Civille and Carr (1999, p.241). From the results of the Rank preference test, the F1 formulation of concentrate was set. The F2 and F3 formulations of concentrate were developed by retaining the F1 base formulation and modifying only the lemongrass derivatives. The amounts of LLE and LEOE (F2 and F3) were determined based on the LAE (F1).

The liquid concentrates F0, F1, F2 and F3, obtained after manual homogenization of the ingredients of each formulation, were placed in heat-sealed polyethylene bags (15 x 21 cm), frozen and stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.6 Physicochemical Analyses

The total solid content (TS) of the LAE and the moisture content of the LLE and the lemongrass leaves were determined according to AOAC (1995) and the results expressed as $\text{g}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$ and $\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ (dry weight basis), respectively. The total soluble solid content (TSS) of TLJ and concentrates (F0, F1, F2 and F3) was determined using digital refractometer (Pocket Pal-1, Atago, Tokyo, Japan) and expressed as $^{\circ}\text{Brix}$. For the TLJ samples and concentrates (F0, F1, F2 and F3) it was also determined the vitamin C content using the 2,6-dichlorophenol-indophenol method, expressed as mg of ascorbic acid (AA) $\cdot 100\text{ mL}^{-1}$, and total titratable acidity (TA), expressed as g citric acid $\cdot 100\text{ mL}^{-1}$, according to AOAC (1995). In the same samples the pH was measured using a pH meter (HI 3221, Hanna Instruments Inc., Woonsocket, RI, USA) and the ratio was calculated as the ratio of TSS ($^{\circ}\text{Brix}$) to TA (% citric acid).

The color of the LAE, LLE and concentrates (F0, F1, F2 and F3) was measured using a Minolta® CR-300 colorimeter (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) with a standard illuminant D65 and observer at 10° , previously calibrated using a white reference plate. The color coordinates a^* (red-green) and b^* (yellow-blue), as well as the parameters intensity of the color or chroma (C^*) and hue (H°), were recorded for each sample.

2.7 Determination of Total Phenolic Compounds

The total phenolic content of lemongrass derivatives (LAE, LLE and LEO) and concentrates (F0, F1, F2 and F3) was determined using the Folin-Ciocalteu method, as described by Costa et al. (2012). The LAE and the concentrates were first filtered through filter paper (Whatman N.1). The LLE was mixed with distilled water ($1\text{ g}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$) and

shaken at 300 rpm for 20 min in an orbital shaker (MA 140CFT, Marconi, São Paulo, Brazil). The mixture was allowed to stand at room temperature for 1 h, and then the aqueous extract obtained was filtered through filter paper (Whatman N.1). Before analysis, samples were appropriately diluted with distilled water or 80% aqueous ethanol (LEO). The total phenolic content was determined by comparison to a calibration curve of gallic acid, and the results expressed as μg of gallic acid equivalents (GAE) per mL.

2.8 Determination of Antioxidant Activity

The antioxidant activity of lemongrass derivatives (LAE, LLE, LEO) and concentrates (F0, F1, F2, F3) was determined by DPPH and ABTS scavenging assay. The samples were prepared as described in total phenolic analysis (item 2.7). The LEO was previously dissolved in 80% ethanol ($0.1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.8.1 DPPH assay

The antioxidant activity against the radical DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) was determined according to Brand-Williams et al. (1995), with some modifications (CASAGRANDE et al., 2007). A control was prepared containing all of the reagent solutions, except the sample. The antioxidant activity was determined as a percentage of inhibition of the activity (% IA) in relation to control, according to Equation (4).

$$\% \text{ IA} = 100 - (\text{Absorbance of the sample} / \text{Absorbance of the control}) \times 100 \quad (4)$$

2.8.2 ABTS assay

The antioxidant activity against the free radical ABTS was determined using the method of Sanches-Gonzales et al. (2005). A control was prepared containing all of the reagent solutions, except the sample. The antioxidant activity was determined as a percentage of inhibition of the activity (% IA) in relation to control, according to Equation (4).

2.9 Sensory Analysis of Mixed Beverages

Three mixed beverages were prepared from the dilution of concentrates (F1, F2 and F3) in purified water, and subjected to descriptive analysis and acceptance test. The F0 formulation (used as a control for physicochemical analysis) was not submitted to sensory analysis, since it does not contain lemongrass, only lime juice. The beverages were prepared

on the day of each sensory test, bottled and sealed, and maintained at $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. The tests were performed in individual booths under white light. The samples (30 mL) were served at $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ in transparent plastic cups coded with three-digit random numbers and were presented in randomized order.

2.9.1 Descriptive Analysis

In order to establish the quantitative description of the mixed beverages, twenty students from the Department of Food Science and Technology of State University of Londrina (Londrina, Paraná, Brazil) were initially recruited to compose the descriptive panel. The individuals were subjected to selection sensory tests which consisted of the recognition of the five basic tastes, the astringent sensation and the odor of fifteen aromatic substances (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999, p. 133).

Twelve selected assessors conducted the descriptive terminology development for the mixed beverages using the Grid method (MOSKOWITZ, 1983). The three mixed beverages (F1, F2 and F3) were presented in pairs, and the assessors described the similarities and differences between the formulations in relation to appearance, aroma, flavor and texture. Thus, a consensus list of 11 attributes (descriptors), their definitions and qualitative-quantitative reference samples was generated (Table 1). The score sheet was prepared using 9 cm non-structured scales, anchored at the extremes by “absent” (anchored at 0.0 cm) or “weak” (anchored at 0.5 cm) to the left and “strong” (anchored at 8.5 cm) to the right (PIMENTEL; MADRONA; PRUDENCIO, 2015; CADENA et al., 2013). Training to identify and quantify the attributes was carried out in eight 1-hour sessions using reference samples (minimum and maximum intensity) for each attribute (Table 2).

After training, the performance of each assessor was evaluated. Three samples of mixed beverages prepared for this purpose were presented to the assessors in randomized and monadic form and were evaluated with three replications in different sessions. The intensity of each attribute was assessed using the score sheet prepared during the training sessions. Data from each assessor for each attribute were analyzed by ANOVA and F test. The assessors who showed discriminative ability ($p\text{-value of } F_{\text{sample}} \leq 0.50$), judgements repeatability ($p\text{-value of } F_{\text{repetition}} \geq 0.05$) and consensus with the panel (assessed by comparing the individual average with the panel average for each attribute) were selected (PIMENTEL; MADRONA; PRUDENCIO, 2015; CADENA et al., 2013; DAMASIO; COSTELL, 1991). The twelve selected and trained assessors participated in the final

evaluation of the three mixed beverages (F1, F2 and F3). The beverages were presented to the assessors in randomized and monadic form with three replications in different sessions, and the intensity of each attribute was evaluated in each formulation employing the score sheet previously prepared.

Table 2 - Attributes, definitions and references list developed by the sensory panel to describe the mixed beverages.

Attribute	Definition	Reference
<i>Appearance</i>		
Turbidity	Characteristic that prevents the passage of light, causing lack of transparency.	Weak: Tahiti lime juice and water (1:20). Strong: Tahiti lime juice.
Yellow color	Characteristic color of pineapple juice.	Weak: Concentrate pineapple juice Maguary® and water (1:10). Strong: Concentrate pineapple juice Maguary® and water (1:1).
Green color	Characteristic color of pineapple juice with mint.	Weak: Concentrate pineapple juice Maguary® and water (1:20), mixed with fresh mint leaves (0.25 g.L ⁻¹). Strong: Concentrate pineapple juice Maguary® and water (1:10), mixed with fresh mint leaves (1 g.L ⁻¹).
Dark particles	Presence of insoluble dark particles.	Absent: Tahiti lime juice and water (1:10) with sucrose (80 g.L ⁻¹). Strong: Tahiti lime juice and water (1:10) with sucrose (80 g.L ⁻¹) and coffee Itamaraty® roasted and ground (particle size 60 mesh) (0.6 g.L ⁻¹).
<i>Aroma</i>		
Lemon	Characteristic aroma of fresh lemon juice.	Weak: Tahiti lime juice and water (1:20). Strong: Tahiti lime juice.
Lemongrass	Characteristic aroma of Lemongrass.	Absent: Purified Water. Strong: Lemongrass leaves sliced and macerated.
<i>Flavor</i>		
Lemon	Characteristic flavor of fresh lemon juice (lemonade).	Weak: Tahiti lime juice and water (1:25) with sucrose (40 g.L ⁻¹). Strong: Tahiti lime juice and water (1:10) with sucrose (80 g.L ⁻¹).
Lemongrass	Characteristic flavor of Lemongrass.	Weak: LAE and water (1:100) with sucrose (40 g.L ⁻¹). Strong: LAE and water (1:20) with sucrose (40 g.L ⁻¹).
Acid taste	Taste provided by the citric acid in aqueous solution.	Weak: Citric acid in aqueous solution (0.4 g.L ⁻¹). Strong: Citric acid in aqueous solution (6.5 g.L ⁻¹).
Sweet taste	Characteristic taste of sucrose in aqueous solution.	Weak: Mixed beverage prepared with LAE (25 mL.L ⁻¹), Tahiti lime juice (90 g.L ⁻¹) and sucrose (40g.L ⁻¹). Strong: Mixed beverage prepared with LAE (25 mL.L ⁻¹), Tahiti lime juice (90 g.L ⁻¹) and sucrose (120 g.L ⁻¹).
<i>Texture</i>		
Viscosity	Fluidness level of the sample in the mouth and when is swallowed.	Weak: Purified Water. Strong: Peach juice Tang®, prepared according to the manufacturer recommendation.

LAE = Lemongrass aqueous extract

2.9.2 Acceptance Test

The acceptance test of attributes was carried out with 100 regular consumers of fruit juices (56 women and 44 men), 67% being young people between 18 and 25 years of age and 33% adults between 26 and 50. The three mixed beverages were presented simultaneously and evaluated for its appearance, aroma, flavor, texture and global acceptance, using a

hedonic 9 points structured scale (1 = Dislike extremely; 9 = Like extremely) (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999, p.241). The purchase intent was evaluated using a 5 points structured scale (1 = certainly would not buy; 5 = certainly would buy).

2.10 Experimental Design and Statistical Analysis

The physicochemical experiments were carried out using a randomized design with two replications, and each analysis was performed in triplicate for each repetition. The data obtained in the physicochemical analyses were analyzed by one-way ANOVA (products) and Tukey's means test. Results are reported as mean \pm standard deviation. Sensory experiments were performed using a randomized complete block design. The descriptive analysis was carried out in triplicate and the data obtained were submitted to Principal Component Analysis (PCA), two-way ANOVA (formulations and assessors) with interaction (formulations x assessors) and Tukey's means test. The data obtained in the acceptance test were submitted to two-way ANOVA (formulations and assessors) and Tukey's means test. The level of significance used was 5%. Statistical analysis was performed using SAS (Statistical Analysis System) software (SAS INSTITUTE, 2012) and Statistica 7 software (STATSOFT, 2006).

3. Results and Discussion

3.1 Yield and Physicochemical Properties

From each 100 g of fresh leaves of lemongrass with moisture content of 73.03 ± 0.19 g.100 g⁻¹ it was prepared 400 mL of LAE (1.00 ± 0.01 g TS.100 mL⁻¹) and it was obtained 4 g of LLE with moisture content of 5.58 ± 0.12 g.100 g⁻¹, resulting in a yield of 14 g LLE.100 g⁻¹ leaves (dry weight basis). The yield of essential oil obtained from fresh leaves (1.48 g.100g⁻¹ leaves on a dry weight basis) was similar to that obtained by Costa et al. (2005) for dried leaves of lemongrass (1.45 g.100g⁻¹ leaves on a dry weight basis). The drying process may affect the chemical composition of plants, especially the aromatic ones, due to the loss of volatile substances (COSTA et al., 2005). For this reason, the extraction of essential oils was performed using fresh leaves.

The Tahiti lime juice had a yield of 50%. The same value was reported by Mendonça et al. (2006) and a similar value (47%) was obtained by Pedrão et al. (1999). The parameters TSS, pH, TA and vitamin C analyzed in the Tahiti lime juice (Table 3) had very similar

means values to those determined by Pedrão et al. (1999). In addition, considering that the ratio ($^{\circ}\text{Brix}/\text{TA}$) was almost the same (1.6), it can be stated that the Tahiti lime used in both studies was at the same stage of maturation. The Vitamin C content detected in Tahiti lime juice is consistent with expected values which are from 20 to 40 mg AA.100 mL⁻¹ (MENDONÇA et al., 2006).

With regard to the concentrates, no differences were found ($p \leq 0.05$) between the F0, F1, F2 and F3 formulations in relation to the SST, TA and Vitamin C content as well as for the ratio ($^{\circ}\text{Brix}/\text{TA}$) (Table 3). All concentrates were acidic, although the F1 formulation showed pH slightly higher than the others, indicating a small neutralization effect due to the addition of LAE (25 mL) in this concentrate. The higher value of the ratio in the concentrates compared to the Tahiti lime juice is due to the increase in TSS ($^{\circ}\text{Brix}$), caused by the addition of sucrose, and lower TA of the concentrates.

3.1.1 *Color*

The LLE powder showed higher values for the green ($-a^*$) and yellow ($+b^*$) components and higher chroma (C^*) than the LAE (Table 4). The chroma determines the intensity of the color and can assume values from 0 (for neutral colors such as gray) to 60 (for vivid colors) (JACOMINO; MENDONÇA; KLUGE, 2003). Therefore, higher chroma values mean higher color intensity. Both extracts had hue values (H°) between yellow (90°) and green (180°) (LAWLESS; HEYMANN, 2010, p. 296).

The yellow component ($+b^*$) excelled in the concentrates (Table 4) that showed values near to zero for the green component ($-a^*$). The concentrates with lemongrass had a higher intensity of the color (C^*) than the control without lemongrass. All concentrates had hue values (H°) close to yellow (90°).

Table 3: Physicochemical characteristics of Tahiti lime juice and liquid concentrates.

Parameter	TLJ	F0	F1	F2	F3
TSS (^o Brix)	9.00±0.075	49.40±0.10 ^a	49.67±0.06 ^a	50.33±0.38 ^a	50.47±2.41 ^a
pH	2.34±0.005	2.28±0.02 ^b	2.33±0.01 ^a	2.29±0.01 ^b	2.30±0.01 ^b
TA (g.100mL ⁻¹)	5.73±0.071	3.27±0.04 ^a	3.30±0.05 ^a	3.54±0.19 ^a	3.33±0.23 ^a
Vitamin C (mg.100mL ⁻¹)	32.72±0.26	19.85±0.85 ^a	20.03±0.95 ^a	20.99±0.55 ^a	20.90±1.10 ^a
Ratio (^o Brix/TA)	1.56±0.030	15.11±0.17 ^a	15.05±0.31 ^a	14.26±0.82 ^a	15.18±1.00 ^a

Data expressed as mean ± standard deviation. Different lowercase superscript letters in a same line indicate statistical difference ($p \leq 0.05$) by Tukey's means test. TLJ = Tahiti lime juice; F0 = TLJ + Sucrose; F1 = LAE + TLJ + Sucrose; F2 = LLE + TLJ + Sucrose; F3 = LLE + LEOE + TLJ + Sucrose. LAE = Lemongrass aqueous extract; LLE = Lemongrass lyophilized extract; LEOE = Lemongrass essential oil emulsion.

Table 4: Color parameters of lemongrass derivatives and liquid concentrates.

Sample	a*	b*	C*	H ^o
LAE	-1.95±0.07 ^a	7.50±0.05 ^a	7.75±0.07 ^a	104.54±0.41 ^a
LLE	-5.38±0.17 ^b	21.79±0.84 ^b	22.44±0.86 ^b	103.89±0.11 ^b
F0	-0.84±0.01 ^{ab}	15.18±0.09 ^b	15.2±0.10 ^b	93.17±0.01 ^a
F1	-0.92±0.05 ^a	21.36±1.61 ^a	21.38±1.61 ^a	87.55±0.11 ^d
F2	-0.42±0.03 ^c	19.85±0.87 ^a	19.85±0.87 ^a	88.79±0.14 ^b
F3	-0.78±0.01 ^b	21.03±0.35 ^a	21.04±0.35 ^a	87.88±0.01 ^c

Data expressed as mean ± standard deviation. Different lowercase superscript letters in the same column indicate statistical difference ($p \leq 0.05$) by Tukey's means test. LAE = Lemongrass aqueous extract; LLE = Lemongrass lyophilized extract; LEOE = Lemongrass essential oil emulsion; TLJ = Tahiti lime juice; F0 = TLJ + Sucrose; F1 = LAE + TLJ + Sucrose; F2 = LLE + TLJ + Sucrose; F3 = LLE + LEOE + TLJ + Sucrose. a*: red-green; b*: yellow-blue; C*: chroma; H^o: hue.

3.2 Phenolics

The lemongrass derivatives showed differences ($p \leq 0.05$) in total phenolic content (Table 5). The LAE exhibited total phenolic approximately 20% higher than LLE, demonstrating that may have been losses of chemical compounds or modifications to the extract during the freeze-drying process. On the other hand, the LEO had the highest content of total phenolic ($\mu\text{g GAE.mL}^{-1}$), indicating that bioactive compounds, as the aroma components, are more concentrated in the essential oil than in the extracts. However, the total phenolic levels of LAE, LLE and LEO (Table 5) ($\mu\text{g GAE.mL}^{-1}$) correspond to 107.73 mg.100 g⁻¹ leaves (dry weight basis), 82.13 mg.100 g⁻¹ leaves (dry weight basis) and 3.46 mg.100 g⁻¹ leaves (dry weight basis), respectively. In this case, the lower total phenolic value of the LEO (mg.100 g⁻¹ leaves on dry weight basis) is due to the low yield of essential oil obtained in the hydro-distillation process.

Table 5 - Total phenolic content and antioxidant activity of lemongrass derivatives and liquid concentrates.

Sample	Total phenolic ($\mu\text{g GAE.mL}^{-1}$)	DPPH (% IA)	ABTS (% IA)
<i>Lemongrass</i>			
LAE	72.72 \pm 1.02 ^b	42.39 \pm 1.95 ^b	23.42 \pm 0.69 ^a
LLE	58.21 \pm 0.64 ^c	36.36 \pm 0.40 ^c	20.74 \pm 0.39 ^b
LEO	230.91 \pm 2.83 ^a	65.37 \pm 1.18 ^a	16.80 \pm 0.34 ^c
<i>Concentrate</i>			
F0	61.91 \pm 0.50 ^b	72.05 \pm 0.49 ^b	23.21 \pm 0.43 ^b
F1	77.18 \pm 0.67 ^a	74.09 \pm 0.41 ^a	29.60 \pm 2.35 ^a
F2	78.95 \pm 0.80 ^a	73.62 \pm 0.47 ^a	31.06 \pm 1.46 ^a
F3	76.58 \pm 2.20 ^a	74.32 \pm 0.41 ^a	30.25 \pm 2.52 ^a

Data expressed as mean \pm standard deviation. Different lowercase superscript letters in the same column indicate statistical difference ($p \leq 0.05$) by Tukey's means test. LAE = Lemongrass aqueous extract; LLE = Lemongrass lyophilized extract; LEO = Lemongrass essential oil; LEOE = Lemongrass essential oil emulsion; TLJ = Tahiti lime juice; F0 = TLJ+ Sucrose; F1 = LAE + TLJ + Sucrose; F2 = LLE + TLJ + Sucrose; F3 = LLE + LEOE + TLJ + Sucrose.

Marques and Farah (2009) evaluated the chlorogenic acids content in the methanol extract (40% aqueous methanol) and in the infusion of dried leaves of lemongrass. The chlorogenic acids content in the methanol extract was 84.6 mg.100 g⁻¹ leaves (dry weight basis) and the differences found between the methanolic extract and infusion were very small, indicating that there was a suitable extraction of these compounds in an aqueous medium. According to Figueirinha et al. (2008) the chlorogenic acids are the major phenolic compounds present in lemongrass aqueous extract (infusion oil-free), followed by flavonoids and tannins.

In addition, these compounds have antioxidant properties and their contents can vary according to genetics, climate, soil conditions and cultivation.

The concentrates containing lemongrass derivatives (F1, F2 and F3) were not different ($p \leq 0.05$) relative to total phenolic content (Table 5), but showed higher total phenolic content than the control (F0) without lemongrass.

3.3 Antioxidant Activity

The antioxidant activity (% IA) values of lemongrass derivatives and concentrates are exhibited in Table 5. The antioxidant activity against DPPH free radicals for LAE (Table 5) was lower than that determined by Figueirinha et al. (2008) (62.3%) and by Moraes-de-Souza et al. (2008) ($\approx 70\%$) for lemongrass infusion. Figueirinha et al. (2008) pointed out that the infusion contains essential oil which is extracted by boiling water added to the dried leaves of lemongrass. For this reason a higher % IA was detected in the infusions (hot-water extraction) compared to the LAE (cold extraction).

The antioxidant activity against DPPH free radicals was higher than against ABTS free radicals for all samples. Moreover, samples with higher total phenolic content also showed higher % IA in relation to both, DPPH and ABTS free radicals, except for the LEO that despite the higher total phenolic content, it had the lowest % IA of ABTS free radicals. Probably this is due to polarity issues since in the ABTS assay the solvent used is water whereas in the DPPH assay the solvent is ethanol.

The differences found in antioxidant activity between the two free radical methods DPPH and ABTS are also due to the differences in the principle of the inactivation of free radical of each method. In the DPPH method the antioxidant activity is evaluated according to the ability of the antioxidant compounds to donate hydrogen ions to free radical DPPH, turning it into a relatively stable compound (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). The ABTS method is based on the antioxidant ability to reduce the free radical ABTS, which is thermodynamically possible when the antioxidant compound has lower redox potential than $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (SANCHES-GONZALES et al., 2005).

The concentrates showed antioxidant activity greater than the extracts although these samples were similar with regard to their total phenolic content. According to Allen and Hamilton (1994), ascorbic acid and citric acid can exert a synergistic effect on other antioxidants, resulting in a more pronounced effect. Therefore, the ascorbic acid and citric

acid present in the concentrates (Table 3) might have exerted a synergistic effect on phenolic compounds, increasing the antioxidant activity.

The concentrates with lemongrass derivatives and Tahiti lime juice exhibited high antioxidant activity, considering the fact that the % IA values against DPPH free radicals were above 70% (MELO; ANDRADE, 2010). Therefore, the consumption of the mixed beverages prepared from these concentrates, even with the water dilution, could provide beneficial health effects, contributing to the inactivation of free radicals potentially harmful to the organism. However, in order to be readily accepted by the consumer, these beverages must be perceived by them as having pleasant sensory characteristics.

3.4 Sensory Analysis of Mixed Beverages Prepared From the Concentrates

3.4.1 Descriptive Analysis

The graphical representation of the principal component analysis (PCA) of the quantitative sensory profile is shown in Figure 1. The first two principal components in the PCA (PC1 and PC2) were considered by presenting eigenvalues ≥ 1 according to Kaiser Criterion and by explaining the majority (73.62%) of the total variability among mixed beverages (LAWLESS; HEYMANN, 2010, p.245).

For each principal component, the attributes that showed a correlation coefficient with the component equal or greater than 0.6 (in absolute value) were considered important (MARCHI et al., 2012). Then, in PC1 the attributes with discriminant power were lemon flavor, lemon aroma, viscosity and acid taste (positive correlation) and in PC2, yellow color and turbidity (positive correlation) and dark particles (negative correlation). The attributes lemongrass aroma and lemongrass flavor were important for both PC1 (negative correlation) and PC2 (positive correlation). The sweet taste and the green color showed no importance for PC1 and PC2 ($r < 0.6$) (Figure 1a).

The PCA indicated the attributes that most characterize each formulation of mixed beverage (Figure 1). A difference between the mixed beverages can be observed from the different location (Figure 1b) of each formulation, represented by a triangle with each vertex corresponding to the average value assigned by the sensory panel in each replicate of the analysis. The PC1 separated the mixed beverages formulations with lemongrass extract (F1 and F2) from the formulation with lemongrass essential oil (F3) while PC2 separated the formulation with aqueous extract (F1) from the one with lyophilized extract (F2).

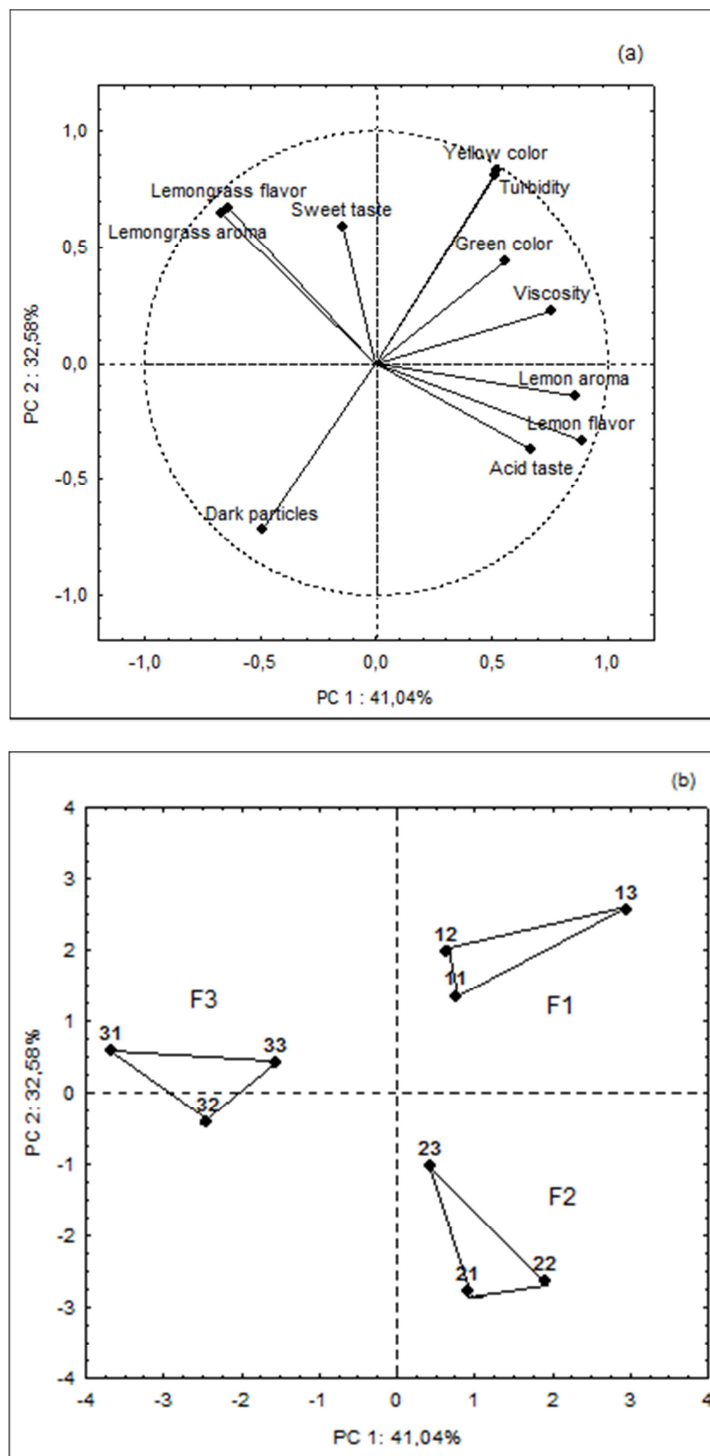


Figure 1 - Projections of descriptive sensory attributes (a) and mixed beverages formulations (b) in the factorial plan (PC1 vs. PC2). Formulations and replicates: F1 (11, 12, 13); F2 (21, 22, 23); F3 (31, 32, 33). F1 = LAE, TLJ and Sucrose; F2 = LLE, TLJ and Sucrose; F3 = LLE, LEOE, TLJ and Sucrose. LAE = Lemongrass aqueous extract; LLE = Lemongrass lyophilized extract; LEOE = Lemongrass essential oil emulsion; TLJ = Tahiti lime juice.

According to the PCA, the F1 formulation was characterized mainly by the attributes yellow color and turbidity; F2, mainly by the attributes lemon aroma and lemon flavor; F3, mainly by the attributes lemongrass aroma and lemongrass flavor. The attribute dark particles is characteristic in both formulations, F2 and F3 (Figure 1a and 1b).

A comparison of the formulations of mixed beverage by Tukey test ($p \leq 0.05$) in relation to the intensity of each descriptive sensory attribute is shown in Table 6. The three formulations showed similarities in the intensity of the green color, lemon aroma, acid taste, sweet taste and viscosity. The mixed beverage prepared from concentrate F1 showed a more intense turbidity and yellow color than the ones prepared from concentrates F2 and F3. On the other hand, concentrates F2 and F3 exhibited the presence of dark particles in the same intensity due to the addition of LLE. Furthermore, concentrates F1 and F3 exhibited a more intense lemongrass aroma and lemongrass flavor, while concentrate F2 showed a more intense lemon flavor than F3.

Table 6 – Means values of the sensory attributes (descriptive and acceptance) and purchase intent of mixed beverage prepared from liquid concentrates.

Attributes	Formulation		
	F1	F2	F3
<i>Descriptive^A</i>			
Turbidity	4.25 ^a	2.29 ^b	2.44 ^b
Yellow color	4.82 ^a	1.84 ^b	1.92 ^b
Green color	1.79 ^a	1.62 ^a	1.50 ^a
Dark particles	0.03 ^b	3.31 ^a	3.50 ^a
Lemon aroma	3.99 ^a	4.00 ^a	2.97 ^a
Lemongrass aroma	3.28 ^a	1.44 ^b	4.36 ^a
Lemon flavor	4.35 ^{ab}	4.62 ^a	3.55 ^b
Lemongrass flavor	3.29 ^a	1.52 ^b	4.07 ^a
Acid taste	3.90 ^a	4.11 ^a	3.71 ^a
Sweet taste	2.71 ^a	2.26 ^a	2.74 ^a
Viscosity	0.81 ^a	0.78 ^a	0.72 ^a
<i>Acceptance^B</i>			
Appearance	7.7 ^a	7.2 ^b	7.2 ^b
Aroma	7.5 ^a	6.3 ^b	7.9 ^a
Flavor	7.4 ^a	6.6 ^b	7.5 ^a
Texture	7.8 ^a	7.3 ^b	7.7 ^a
Global	7.6 ^a	6.8 ^b	7.6 ^a
<i>Purchase Intent^C</i>			
	4.0 ^a	3.3 ^b	4.0 ^a

Means with different lowercase superscript letters in the same line indicate statistical difference ($p \leq 0.05$) by Tukey's means test. ^A 12 selected and trained assessors, 9 cm non-structured scale; ^B 100 regular juice consumers, hedonic 9-point scale (1-Dislike extremely; 9-Like extremely); ^C 100 regular juice consumers, 5-point scale (1- certainly would not buy; 5-certainly would buy); F1=LAE + TLJ + Sucrose; F2=LLE + TLJ + Sucrose; F3=LLE + LEOE + TLJ + Sucrose. LAE: Lemongrass aqueous extract; LLE: Lemongrass lyophilized extract; LEOE: Lemongrass essential oil emulsion; TLJ: Tahiti lime juice.

The difference found to the formulation F1 in relation to F2 and F3 on the intensity of the descriptive attribute yellow color was not detected by the instrumental measure, since there was no difference between formulations with respect to the intensity (C^*) and the yellow (b^*) color parameters. However, the similarity on the intensity of the descriptive attributes acid taste and sweet taste corroborate with the physicochemical parameters TA (total acidity) and TSS ($^{\circ}$ Brix), respectively, which also did not differ between the three formulations (F1, F2 and F3).

3.4.2 Acceptance

The three mixed beverages prepared from concentrates (F1, F2 and F3) had acceptances greater than 6.3 on a hedonic 9-point scale, for all attributes (Table 6), indicating approval by the potential consumer. The F1 and F3 formulations of mixed beverage had the same acceptance relative to the attributes of aroma, flavor and texture; while in relation to its appearance, the F1 mixed beverage was more highly accepted. The F2 formulation was less appreciated than F1 and F3, but relative to its appearance had acceptance similar to F3. The F1 formulation was more accepted for its appearance (Table 6) probably due to its greater turbidity, more intense yellow color and less intense presence of dark particles than the F2 and F3 formulations (Table 6). The F1 and F3 formulations were the most appreciated relative to the aroma and flavor probably due to their more intense lemongrass aroma and lemongrass flavor than F2.

The mixed beverages prepared from concentrates F1 (with LAE) and F3 (with LLE + LEOE) formulations had the highest global acceptance, indicating that F1 and F3 formulations were the most appreciated. The results found in the acceptance test corroborate the purchase intention results (Table 6), since potential consumers would probably buy the F1 and F3 mixed beverages while showed indifference with respect to the F2 mixed beverage, according to the 5-point scale.

The F2 formulation containing only LLE would not be the best option for the consumer market. However, the addition of LEO to this formulation, yielding the F3 formulation, increased the intensity of both lemongrass aroma and flavor, improved acceptance in relation to all attributes (except for appearance), and led to a global acceptance and purchase intention similar to the F1 formulation, with LAE. Therefore, considering the sensory aspect, it would be advisable to use LLE together with LEO in the formulation of a concentrate with lemongrass and Tahiti lime juice for the preparation of mixed beverage well

accepted. Moreover, regarding the functionality of bioactive compounds, since formulations of liquid concentrates with lemongrass derivatives showed the same antioxidant activity, the F3 formulation (with LLE and LEOE) could provide the same beneficial health effects as the F1 formulation (with LAE). Regarding the technological aspects, the F3 formulation would facilitate industrial processing, since lemongrass derivatives are readily available for utilization.

4. Conclusion

This study is the first to describe the use of lemongrass derivatives such as aqueous extract, lyophilized extract and essential oil, in concentrates for the preparation of mixed beverages. The liquid concentrates elaborated have favorable physicochemical characteristics such as acidity and color, and contain bioactive compounds (vitamin C and phenolics) that confer to the product important antioxidant properties. In the formulation of the concentrate should be used, preferably, the aqueous extract of lemongrass or the lyophilized extract with the addition of essential oil, since these concentrates lead to mixed beverages with greater intensities of lemongrass aroma and flavor, which are most appreciated. This study demonstrates that it is possible to elaborate concentrates with lemongrass derivatives and lime juice for the preparation of mixed beverages which are both sensory pleasant and potentially beneficial to the consumer's health.

Acknowledgments

This study was carried out with the financial support of the Brazilian Science and Technology Research Council (CNPq, process number 306429/2015-2) and the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES). The authors would like to thank Dr. José Roberto Pinto de Souza, Professor and Director of Center of Agricultural Sciences, for the support to this research.

References

- ALLEN, J.C., HAMILTON, R.J. (1994). **Rancidity in Foods**. 3rd ed. Glasgow: Chapman e Hall. 290p.
- ALMEIDA, T.S. et al. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 630– 633, 2013.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1995. 1141 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade de refresco, refrigerante, preparado ou concentrado líquido para refresco ou refrigerante, preparado sólido para refresco, xarope e chá pronto para o consumo. **Portaria N. 544**, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores e industrializadores de alimentos. **Portaria SVS/MS N. 326**, 1997.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CADENA, R.S. et al. Sensory profile and physicochemical characteristics of mango nectar sweetened with high intensity sweeteners throughout storage time. **Food Research International**, v. 54, p. 1670–1679, 2013.

CASAGRANDE, R. et al. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 183–190, 2007.

CODEX ALIMENTARIUS. Recommended International Code of Practice. General Principles of Food Hygiene. CAC/RCP 1-1969. Revisions, 2003. 31p.

COSTA, A.S.G. et al. Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, p. 324-328, 2012.

COSTA, L.C.B. et al. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 956-959, 2005.

DAMASIO, M.H.; COSTELL, E. Análise sensorial descritiva: generación de descriptores y selection de catadores. **Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 165-178, 1991.

FIGUEIRINHA, A. et al. *Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. **Food Chemistry**, v. 110, p. 718–728, 2008.

JACOMINO, A.P.; MENDONÇA, K.; KLUGE, R.A. Cold storage of ‘siciliano’ lemon treated with ethylene. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 45-48, 2003.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food**. New York: Chapman & Hall, 2010. 596p.

LUZIA, D.M.M.; JORGE, N. Antioxidant activity of lemon seed extract (*Citrus limon*) added to soybean oil in accelerated incubator-storage test. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 946-949, 2009.

- MARCHI, R. et al. Sensory profile and stability of a new ready-to-drink passion fruit juice beverage with different sweetener systems. **CENTRUM Católica's Working Paper** n. 2012-09-0016, p. 1-34, 2012.
- MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370–1376, 2009.
- MEILGAARD, M.C.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory Evaluation Techniques**. 3th edition. CRC Press: Boca Raton, FL, 1999. 387p.
- MELO, E.A.; ANDRADE, R.A.M.S. Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos do umbuzeiro. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 453-457, 2010.
- MENDONÇA, L.M.V.L. et al. Chemical composition and Tahiti lime industrial residues output characterization. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 4, p. 870-874, 2006.
- MIRHOSSEINI, H. et al. Optimization of the contents of Arabic gum, xanthan gum and orange oil affecting turbidity, average particle size, polydispersity index and density in orange beverage emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1212-1223, 2008.
- MORAES-DE-SOUZA, R.A. et al. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. **Cienc. Tecnol. Aliment.** v. 6, n. 1, p. 41-47, 2008.
- MOSKOWITZ, H.R. **Product testing and sensory evaluation of foods**. Westport: Food & Nutrition Press, 1983. p.605
- OLIVEIRA, A.C.G. et al. Effects of heat treatment and gamma radiation on the characteristics of pure sugarcane juice and mixed with fruit juices. **Food Science and Technology**, v. 27, n.4, p. 863-873, 2007.
- PEDRÃO, M.R. et al. Sensory and physicochemical stability of frozen Tahiti lime juice, natural and sweetened. **Food Science and Technology**, v. 19, n. 2, p. 282-286, 1999.
- PIMENTEL, T.C.P.; MADRONA, G.S.; PRUDENCIO, S.H. Probiotic clarified apple juice with oligofructose or sucralose as sugar substitutes: Sensory profile and acceptability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 838-846, 2015.
- RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.
- SANCHES-GONZALES, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffee brewed using different procedures (Italian, Espresso and Filter). **Food Chemistry**, v. 90, p. 133-139, 2005.
- SILVA, M.A.L. et al. Evaluation of the chemical composition of *Cymbopogon citratus* Stapf growing in environments with different pollution levels and the influence on tea composition. **Acta Scientiarum**, v. 32, n. 1, p. 67-72, 2010.

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Effects of High Hydrostatic Pressure Treatment on Physicochemical and Microbiological Parameters, Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Lemongrass-Lime Mixed Beverage

Dirlei Diedrich Kieling^a, Gustavo V. Barbosa-Cánovas^b and Sandra Helena Prudencio^{a,*}

^aFood Science and Technology Department, State University of Londrina, Londrina, PR 86057-970, Brazil. *Corresponding author: sandrah@uel.br Tel./fax: +55 43 3371 4080

^bBiological Systems Engineering Department, Washington State University, Pullman, WA 99164–6120, USA

ABSTRACT

This study determined the conditions of pressure and time for high hydrostatic pressure (HHP) treatment of lemongrass-lime mixed beverage. The HHP treated beverage had its physicochemical and microbiological characteristics, bioactive compounds and antioxidant capacity evaluated, in the day of processing (time zero) and during eight weeks of storage at 4°C, and compared to untreated (control) and thermally pasteurized beverages. The best conditions for HHP treatment were 250 MPa for 1 min at 25 °C that ensured microbiological safety, on inactivation tests with *Listeria innocua* as the target microorganism, without significant losses of vitamin C and phenolic compounds. HHP treated mixed beverage retained the original content of bioactive compounds and presented physicochemical quality characteristics closer to the untreated, in the day of processing, in comparison with thermally pasteurized. In addition, the HHP processing provided microbiological quality and improved the shelf-life of the untreated beverage, evidencing that it consists in a reliable alternative to thermal treatment of lemongrass-lime mixed beverage.

Keywords: Nonthermal processing; *Cymbopogon citratus*; Vitamin C; Phenolics; Antioxidants; Shelf-life.

1. Introduction

Lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) is an aromatic plant of the Poaceae family originally from India and typically found in tropical countries (MACHADO et al., 2015). Its

leaves are widely used to prepare medicinal tea and also as a culinary ingredient because of their citrus flavor, especially in Asian cuisine. From lemongrass leaves can be obtained extracts rich in phenolic compounds with antioxidant properties as well as essential oil containing citral as the major component (65-86%), chlorogenic acid, limonene, luteolin, menthol and others as minor components (SILVA et al., 2010; FIGUEIRINHA et al., 2008; MARQUES; FARAH, 2009). Some of the medicinal properties attributed to lemongrass are analgesic, antipyretic, sedative, antimicrobial and anticancer (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; MACHADO et al., 2015).

Lime is one of the largest citrus fruits of commercial relevance in Brazil and it is produced during the entire year, since there is no off-season for this fruit. In addition, it is also a source of antioxidants such as phenolic acids, flavonoids and vitamin C (LUZIA; JORGE, 2009). Due to their refreshing and pleasing flavor (OLIVEIRA et al., 2007), limes are widely used in culinary, in the production of beverages and juice concentrates (MENDONÇA et al., 2006).

Mixed beverage is a kind of nonalcoholic beverage containing at least two characteristic ingredients which may be a combination of fruit juice, fruit pulp, vegetables and extracts (BRASIL, 2013). Lemongrass-lime mixed beverage is a home-made cold drink widely appreciated in South Brazil, but still not available as a ready-to-drink product in the market. Kieling and Prudencio (Unpublished data; manuscript in preparation) have formulated concentrates with lemongrass derivatives and Tahiti lime juice to prepare lemongrass-lime mixed beverages. Concentrates showed high antioxidant capacity and were preserved by freezing. The lemongrass-lime mixed beverages prepared by simple dilution of concentrates in water presented physicochemical and sensory characteristics favorable and were well accepted by juice consumers.

Nowadays, consumers are looking for high quality and healthy food products. To attend to this market demand, food industry needs processes that are able to ensure microbiological safety and stability during shelf-life, preserving nutritional and beneficial aspects (MARTÍNEZ-FLORES et al., 2015). It is known that thermal processing of food results in a decrease of vitamins (SANCHO et al., 1999), nutritional content (MARTÍNEZ-FLORES et al., 2015) and antioxidants (MEDINA-MEZA et al., 2015; PATRAS et al., 2009), besides undesirable changes in flavor, taste and color (BERMÚDEZ-AGUIRRE; BARBOSA-CÁNOVAS, 2012). While in nonthermal treatments such as high hydrostatic pressure (HHP) nutritional losses and sensory changes are minimal (MEDINA-MEZA et al., 2015; PATRAS

et al., 2009; SANCHO et al., 1999). HHP treatment also allows a better retention of bioactive compounds (PATRAS et al., 2009) and antioxidant activity (MEDINA-MEZA et al., 2015).

According to Patras et al. (2009), small molecules such as volatile compounds, pigments and vitamins are not considerably affected by HHP. On the other hand, high-molecular-weight molecules, more specifically proteins and carbohydrates, can suffer structural changes such as protein denaturation, protein or starch gelling and changes in muscle protein structures of meat, modifying their functional properties and food texture (PATRAS et al., 2009; GUERRERO-BELTRÁN; BARBOSA-CÁNOVAS; SWANSON, 2005; CABRAL NETO; ROSENTHAL; GASPAR, 2011).

HHP can be applied to inactivate microorganisms and enzymes, in order to ensure microbial safety and extend shelf-life of food products (GUERRERO-BELTRÁN; BARBOSA-CÁNOVAS; SWANSON, 2004). The process consists in the application of hydrostatic pressure ranging from 100 to 800 MPa into liquid or solid food, packaged or not, leading to microorganisms inactivation by protein denaturation, cell injury or cell disruption (BUTZ; TAUSCHER, 2002; GUERRERO-BELTRÁN; BARBOSA-CÁNOVAS; SWANSON, 2005).

Juices are required to achieve the pasteurization standard of 5-log pathogen reduction after processing for public health reasons (FDA, 2015). The inactivation of a number of pathogenic microorganisms such as *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* by nonthermal treatments of fruit juices, nectar, purées and other kind of food products have been reported (BERMÚDEZ-AGUIRRE; BARBOSA-CÁNOVAS, 2012; PATRAS et al. 2009; MARTÍNEZ-FLORES et al. 2015).

Listeria monocytogenes, one of the pathogenic target microorganisms used in food processing, has the ability of growing under conditions that other foodborne bacteria cannot survive and can also be more heat resistant. *Listeria innocua*, the nonpathogenic form of *Listeria*, possess the same characteristics of *L. monocytogenes* once they are very similar phenotypically, which enable both of them to grow in the same environmental conditions. Since *L. innocua* is closely related to *L. monocytogenes* and due to its nonpathogenic characteristic, it is been considered as an alternative target microorganism to the pathogenic ones (SILVA-ANGULO et al. 2015; CALDERON-MIRANDA; BARBOSA-CÁNOVAS; SWANSON, 1999; FAIRCHILD; FOEGEDING, 1993).

No information is available related to thermal or nonthermal processing of lemongrass-lime mixed beverage. Also the effects of high pressure treatment on bioactive compounds and physicochemical and microbiological characteristics of a lemongrass and

lime based product is unknown. For this reason, the purpose of this study was to determine the high hydrostatic pressure processing conditions for nonthermal treatment of lemongrass-lime mixed beverage, evaluating its effects on physicochemical and microbiological parameters, bioactive compounds and antioxidant capacity, in the day of processing (time zero) and weekly during storage at 4°C, compared to untreated (control) and to traditional thermal pasteurization.

2. Material and Methods

2.1 Chemicals and culture media

L-ascorbic acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 2 N, Sodium carbonate, Gallic acid, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid (Trolox) were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Tryptic Soy Agar (TSA), Tryptic Soy Broth (TSB), Yeast Extract (YE), Plate Count Agar, Potato Dextrose Agar and Violet Red Bile Agar were obtained from Difco (Difco, Becton, Dickinson & Company, Sparks, MD, USA).

2.2 Mixed beverage preparation

Lemongrass-lime mixed beverage was prepared in the day of processing as follows: lemongrass lyophilized extract (0.26 g.L⁻¹), lemongrass essential oil emulsion (1.875 g.L⁻¹), lime juice (90 g.L⁻¹), sucrose (80 g.L⁻¹), ascorbic acid (196 mg.L⁻¹) and ultrapure water were mixed together using a blender. Samples of mixed beverage were subjected to physicochemical and microbiological analysis immediately after preparation.

The lemongrass essential oil emulsion used in the mixed beverage preparation was made out with lemongrass essential oil, xanthan gum and water (1:1:48 g:g:mL) using a high speed stirrer (IKA overhead stirrer RW 20, Staufen, Germany). The aqueous phase xanthan-water was prepared first, according to Mirhosseini et al. (2008) recommendation, adapted by Kieling and Prudencio (Unpublished data; Artigo 1). Lemongrass essential oil was gradually added to this mixture and mixed during 5 minutes to obtain a homogeneous and stable dispersion. The lime juice was obtained in the following way: Fresh Tahiti limes were washed and sanitized with chlorine solution (150 mg.L⁻¹). After this, fruits were cut into halves and the juice extracted using a manual extractor. The solid particles were then separated out using cheese cloth.

2.3 Inoculum preparation

Listeria innocua (ATCC 51742) pure lyophilized strains were obtained from a culture collection (Manassas, VA, USA). Stock vials of initial culture were prepared as described by Saucedo-Reyes (2009) and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until they were used to determine the growth curve and to obtain subculture of *L. innocua* for inactivation experiments, as follows.

Growth curve: One stock vial of *L. innocua* was inoculated into 100 mL of tryptic soy broth enriched with 0.6% of yeast extract (TSBYE). This mixture was shaken constantly at 225 rpm and kept at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Samples were taken each 30 min and the absorbance at 600 nm was determined and used to design the growth curve by optical density (FRANCOIS, 2005). The early stationary growth phase was reached with 6 h (Figure 1).

Subculture: Initial culture of *L. innocua* (one stock vial) was grown in 100 mL of TSBYE under constant agitation (225 rpm) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 h (exponential phase, Figure 1) to obtain a cell concentration of 3.5×10^8 colony forming units per mL (cfu.mL^{-1}). Then glycerol 20% (100 mL) was added and the suspension was dispensed into falcon tubes (10 mL) and stored at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

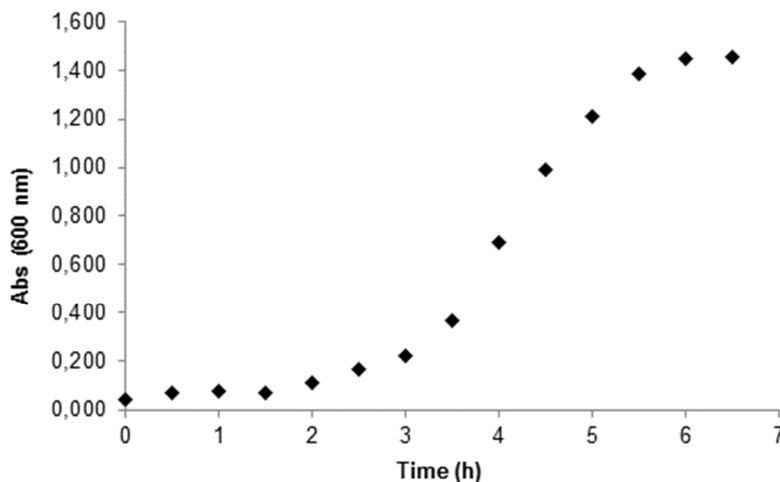


Figure 1 - Growth curve of *Listeria innocua* in TSBYE at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (experimental data).

For the HHP or thermal inactivation experiments, two subculture tubes (20 mL) were initially added to 50 mL of TSBYE and let rest for 20 min at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ to reactivate *L. innocua* cells. Then, this suspension was inoculated into 350 mL of lemongrass-lime mixed beverage prior to HHP or thermal treatment to obtain an initial cell concentration of approximately 6 log cfu.mL^{-1} .

2.4 High hydrostatic pressure processing

Samples of mixed beverage (50 mL) were dispensed into polypropylene 15 cm x 24 cm packages (Ultravac Solutions, Kansas City, MO, USA) and vacuum sealed for HHP processing. Three packages of sample were placed inside the cylindrical chamber (10 cm of internal diameter and 25 cm of internal height) of a high hydrostatic pressure unit (Engineered Pressure Systems Inc., Haverhill, MA, USA) for each cycle of processing. The unit was operated with a high pressure pump (Hochdruck Systeme GmbH, Pötsching, Austria) and the pressurization fluid was a solution of 10% Hydrolubric 123B soluble oil (Houghton International Inc., Valley Forge, PA, USA) and 90% water. Come up time was 0.5 min and depressurization time was 0.2 min. Samples were processed at pressure ranging between 200 and 400 MPa, holding time of 1 and 2 min and fixed temperature of 25 °C. Right after treatment, samples were cooled down in a water-ice bath.

First, the effects of pressure and time on vitamin C, total phenolic and inactivation of *L. innocua* were studied. Then, the best condition of pressure and time for HHP process, at a fixed temperature, was determined based on two principles: ensure inactivation of *L. innocua*, used as a target microorganism, and have no significant losses of bioactive compounds (vitamin C and total phenolic). After, the best condition determined for HHP process was applied for shelf-life study.

2.5 Thermal pasteurization

Thermal pasteurization conditions were established based on FDA (2004) recommendation and in preliminary tests using *L. innocua* (ATCC 51742) as a target microorganism. A complete inactivation of *L. innocua* initially inoculated ($6 \log \text{cfu.mL}^{-1}$) was verified when samples of mixed beverage were treated at 71.1 °C for 3 sec. For thermal pasteurization, samples of lemongrass-lime mixed beverage (350 mL) were put into a double walled glass cylinder, with heat water circulation, and maintained under continued agitation with a magnetic stirrer. The temperature was kept constant (± 0.1 °C) using a re-circulating water bath (VWR Scientific, Model 1166, Niles, IL, USA) and monitored using a thermocouple (K type, Omega Engineering, Inc., Stamford, CT, USA) positioned into the core of the liquid volume. The time was recorded when the temperature in the core reached 71.1 °C. Once the treatment was completed the liquid was immediately cooled down in a water-ice bath.

2.6 Shelf-life study

Samples of lemongrass-lime mixed beverage untreated (control), treated by HHP and thermally pasteurized were aseptically packaged into 25 mL glass bottles and stored at 4 °C during 8 weeks for shelf-life study. Samples of each treatment and control were analyzed in the day of processing (zero time) and weekly with regard to pH, acidity, Brix, color, ascorbic acid, total phenolic, antioxidant capacity, total mesophiles (standard plate count), total coliforms, molds and yeast.

2.7 Physicochemical analyses

Samples were centrifuged (Sorvall Centrifuge RT 6000B, DuPont Company, Newtown, CT, USA) at 5000 rpm and 10 °C for 10 min before physicochemical analyses, with exception of color and pH determination.

2.7.1 pH, acidity and Brix

The pH of lemongrass-lime mixed beverages was measured using pH meter (Model FE20, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) previously standardized with buffer solutions. Total titratable acidity (TA) was determined by titration according to AOAC (1995) and expressed as g citric acid.100 mL⁻¹. The total soluble solids content (°Brix) was determined using digital refractometer (Pocket Pal-α, Atago, Tokyo, Japan).

2.7.2 Color

The color of samples was measured using a Minolta CM-5 spectrophotometer (Konica Minolta Inc., Osaka, Japan) with a standard illuminant D65 and observer at 10°. Color was expressed as L* (lightness), a* (red-green) and b* (yellow-blue). In addition, chroma (C*) and hue (H°) were calculated using equations (1) and (2), respectively (HUTCHINGS, 1999, pp. 227).

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (1)$$

$$H^{\circ} = \tan^{-1}(b^*/a^*) \quad (2)$$

2.7.3 Bioactive compounds

2.7.3.1 Ascorbic acid

The ascorbic acid (vitamin C) content was quantified by 2,6-dichlorophenol-indophenol titration method (AOAC 1995) using an extracting solution of metaphosphoric acid-acetic acid. Results were expressed as mg ascorbic acid.100 mL⁻¹.

2.7.3.2 Total Phenolic Compounds

The total phenolic compounds were analysed using the Folin-Ciocalteu method, as described by Costa et al. (2012). The total phenolic content was quantified by comparison to a calibration curve of gallic acid, and the results expressed as µg of gallic acid equivalents (GAE) per mL (µg GAE.mL⁻¹).

2.8 Antioxidant capacity

The antioxidant capacity of lemongrass-lime mixed beverage was determined by DPPH scavenging assay according to Brand-Williams et al. (1995), with minor modifications (CASAGRANDE et al., 2007). A control of DPPH solution was prepared containing all reagent solutions, except the sample. The antioxidant capacity against the radical DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) was quantified by comparison to a calibration curve of Trolox, and the results expressed as µg of Trolox equivalent (TE) per mL (µg TE.mL⁻¹).

2.9 Microbiological analysis

For *Listeria innocua* enumeration, one milliliter of sample was pour-plated in Tryptic Soy Agar enriched with 0.6% Yeast Extract (TSAYE) and plates were incubated at 37 °C for 48 h (CALDERON-MIRANDA; BARBOSA-CÁNOVAS; SWANSON, 1999). To evaluate microbiological stability during storage, one milliliter of each sample was pour-plated in Plate Count Agar for total mesophiles (MARTÍNEZ-FLORES et al., 2015) and in Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG) for total coliforms enumeration (VELÁZQUEZ-ESTRADA et al., 2012). These plates were incubated at 35 °C for 48 h. For molds and yeast enumeration, one milliliter of each sample was pour-plated in Potato Dextrose Agar and plates were incubated at 21 °C for 7 days (MARTÍNEZ-FLORES et al., 2015). When necessary, samples were serially diluted in 0.1% peptone water. After the required time for each microorganism, the colonies were counted and the microbial enumeration was expressed as colony forming units per mL (cfu.mL⁻¹).

2.10 Statistical analysis

All experiments were conducted in triplicate. Differences between treatments (untreated and HHP at different process conditions) were determined by one-way ANOVA and Tukey's means test ($p \leq 0.05$). The experimental data of shelf-life study were analyzed according to a Split-Plot system, where the main treatment was the process (untreated, HHP at 250 MPa and 25 °C for 1 min and thermal pasteurization) and the secondary treatment was the storage time (weeks). Differences were determined by Tukey's means test ($p \leq 0.05$). Multiple correlation analysis was carried out to identify correlations between physicochemical parameters. Statistical analyses were conducted using Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE, 2012) and Statistica 7 software (STATSOFT, 2006). Results are reported as mean \pm standard deviation of three observations.

3. Results and Discussion

3.1 Establishing the conditions to the HHP treatment

The vitamin C and phenolic content of lemongrass-lime mixed beverage before (untreated) and after HHP treatment are shown in Table 1. The mixed beverage presented no significant changes ($p \leq 0.05$) in the content of vitamin C after HHP treatment at different processing conditions compared to the untreated mixed beverage (control). The phenolic content of HHP processed beverage had no significant changes for pressure up to 250 MPa, but decreased 5.52% ($p \leq 0.05$) in comparison with the untreated mixed beverage when pressure higher than 300 MPa was applied, independent of time. However, there was no difference in the content of phenolic in the range of pressure between 300 and 400 MPa, independent of time.

Patras et al. (2009) studied the impact of HHP treatment on vitamin C and phenolic contents of strawberry and blackberry purées. They verified that the vitamin C content of untreated purées decreased significantly (about 9%) after HHP treatment independent of pressure applied (400, 500 or 600 MPa). The phenolic content did not change significantly when samples were processed at 400 MPa and 20 °C for 15 min, but increased ($p \leq 0.05$) at higher pressure (600 MPa) compared to untreated. According to the authors, this increase in the total phenolic content may be related to an increased extractability of some phenolic compounds by high-pressure processing.

Table 1: Vitamin C and total phenolic content of lemongrass-lime mixed beverage before and after HHP treatment at different process conditions.

Treatment	Vitamin C (mg.100mL ⁻¹)	Phenolic (µg.mL ⁻¹)
Untreated	22.50 ± 0.5 ^a	159.84 ± 2.73 ^a
200MPa/1min	22.50 ± 0.5 ^a	157.51 ± 0.59 ^a
200MPa/2min	22.00 ± 0.5 ^a	158.91 ± 1.87 ^a
250MPa/1min	22.50 ± 0.5 ^a	158.60 ± 2.36 ^a
250MPa/2min	22.83 ± 0.3 ^a	157.59 ± 1.42 ^a
300MPa/1min	22.66 ± 0.3 ^a	150.85 ± 1.19 ^b
300MPa/2min	22.83 ± 0.3 ^a	148.99 ± 2.03 ^b
400MPa/1min	21.33 ± 0.8 ^a	152.24 ± 0.67 ^b
400MPa/2min	21.50 ± 0.9 ^a	152.01 ± 1.42 ^b

Data expressed as mean ± standard deviation of process triplicate. Different lowercase letters in the same column indicate statistical difference ($p \leq 0.05$) by Tukey's means test.

However, besides the pressure-induced extraction, there is also a degradative effect (MEDINA-MEZA et al., 2015). When the extraction induced by high-pressure processing is higher than the degradation, an accumulative effect takes place. Otherwise, a decrease is observed. Thus, the decrease in the phenolic content of the mixed beverage after HHP treatment at pressure higher than 300 MPa (Table 2) can be attributed to a degradative effect higher than the extraction.

Medina-Meza et al. (2015) had no significant losses of vitamin C in spinach sauce processed by HHP at 400 MPa for 5 min, but they obtained a reduction in its content between 20 and 30% at higher time or pressure. In their research, vitamin C content was time-dependent. The authors suggested that there is an effect of food matrix on the vitamin C degradation.

Jandhyala, Barbosa-Canovas and Swanson (2002) studied the effects of HHP and thermal sterilization on vitamin retention, using standard solutions at different pH (2.2, 4.5 and 6.0). They found out that vitamin C retention was higher at pH 2.2 or 4.5 than at pH 6.0 after HHP or thermal treatments. The greater retention of vitamin C in acidic pH is due to the fact that ascorbic acid is more stable to treatment in acidic pH (GREGORY 2010, p.366; JANDHYALA; BARBOSA-CANOVAS; SWANSON, 2002). As shown in Table 1, the mixed beverage (pH about 2.7) retained 100% of the original vitamin C content after HHP processing regardless pressure and time, in the range studied.

According to FDA (2004), *Listeria monocytogenes* is one of the vegetative bacterial pathogens that may occur in acidic juices (pH 4.6 or less), and can be target for safety performance tests. The FDA guidance states that the treatment must be capable of achieving at least 5-log pathogen reduction in the juice (minimum requirement). In the present study, *Listeria innocua* (nonpathogenic) was chosen as the target microorganism for inactivation experiments instead of *Listeria monocytogenes* (pathogenic) as recommended by Calderon-Miranda, Barbosa-Cánovas and Swanson (1999) and Fairchild and Foegeding (1993).

The enumeration of *L. innocua* (cfu.mL⁻¹) before and after HHP treatment is presented in Figure 2. For samples treated at 200MPa it was verified an inactivation of 5 log (cfu.mL⁻¹) of *L. innocua* in 1 min and 6 log (cfu.mL⁻¹) in 2 min. Samples treated at pressure higher than 250MPa had a completely inactivation of *L. innocua* in 1 min.

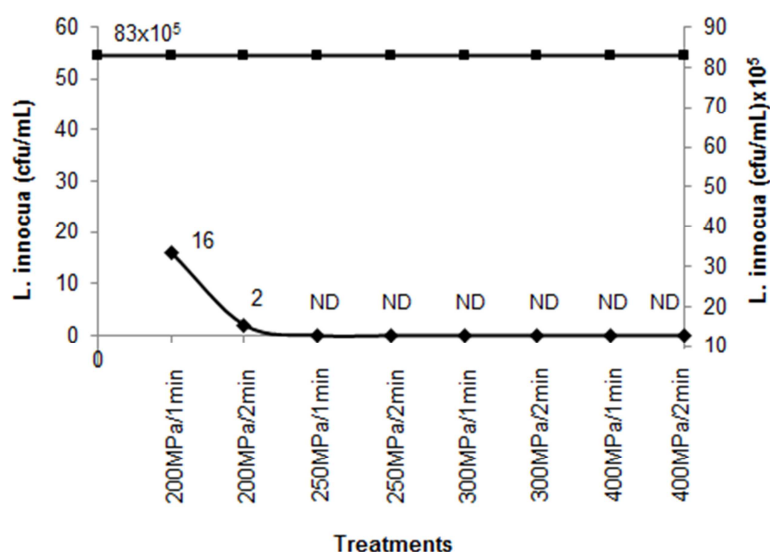


Figure 2 - Enumeration of *L. innocua* in the mixed beverage before and after HHP treatment.

■ Untreated; ◆ HHP

According to Wang et al. (2016) pressure, pH value, and temperature are crucial factors that affect high-pressure processing with respect to enzymes and microbial inactivation. Velázquez-Estrada (2012) verified that for orange juice, which are known to have low pH (about 3.6), processing at pressure from 200 to 300 MPa and temperature of 20 °C for short time (30 sec) were able to ensure microbial quality and inactivate enzymes. Likewise, the acidic pH of the mixed beverage (about 2.7) may have contributed to the target

microorganism inactivation by HHP at mild process conditions of pressure, time and temperature.

Considering the microbiological safety of the mixed beverage and the preservation of bioactive compounds, it is important to highlight that the target microorganism inactivation was successfully reached in 1 min at 250 MPa and 25 °C of temperature (Figure 2). In addition, there were no significant losses of vitamin C and phenolic content when applying these combinations of pressure, time and temperature.

A high-pressure processing design should be focused on a high production rate to attend the industry demand (high production per hour) (FARKAS, 2016). Thus, the lower is the time of processing at a given pressure the greater will be the number of cycles per hour, enhancing the production rate. Based on this concept, in the preliminary results obtained and in the two principles previously mentioned, the best conditions determined for processing the lemongrass-lime mixed beverage by HHP for shelf-life study were 250 MPa of pressure for 1 min at 25 °C.

3.3 Shelf-life study

The results obtained in the microbiological analyses of the mixed beverage samples (untreated, treated by HHP at 250 MPa and 25 °C for 1 min and thermally pasteurized) during 8 weeks of storage at 4 °C are shown in Figure 3.

The HHP treatment inactivated 85.71% of total mesophiles (Figure 3A) and 89.47% of molds and yeast (Figure 3B) initially present in the untreated beverage. The HHP processed beverage was stable during 5 weeks in relation to total mesophiles (Figure 3A) and during 4 weeks in relation to molds and yeast (Figure 3B), with very low counting (cfu.mL^{-1}) in the respective period. After 4-5 weeks of storage, these microorganisms started to grow, even though the counting of total mesophiles (standard plate count) and molds and yeast (cfu.mL^{-1}) in HHP samples was always lower than untreated, from the preparation (time zero) to the end of cold storage, indicating that HHP treatment improved the microbiological quality of untreated lemongrass-lime mixed beverage. As shown in Figure 3, the microbial growth after 5 weeks happened at a higher level and with more intensity in untreated than in HHP samples.

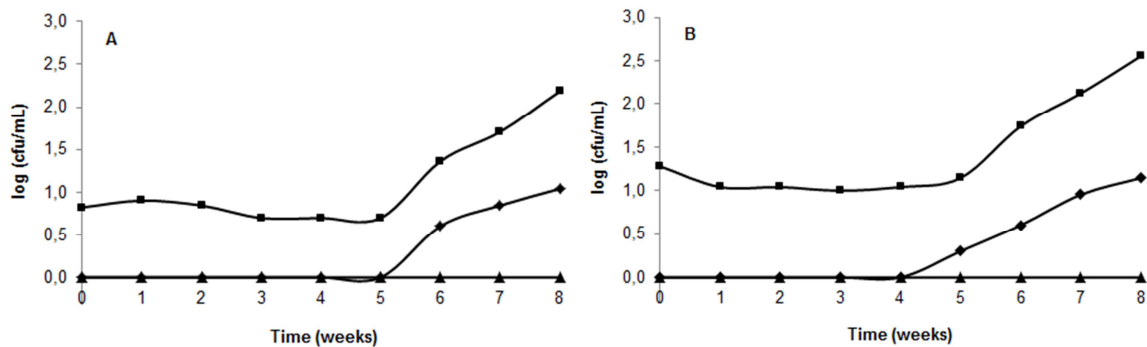


Figure 3 - Growth of total mesophiles (A) and molds and yeast (B) on lemongrass-lime mixed beverage during cold storage. ■—Untreated; ◆—HHP; ▲—Thermal pasteurization

The thermally pasteurized mixed beverage was stable during 8 weeks (56 days) of storage at 4 °C in relation to total mesophiles (standard plate count) (Figure 3A) and molds and yeast (Figure 3B), probably because once these microorganisms are not thermal resistant they were effectively inactivated by the thermal pasteurization.

Considering the acceptable level of standard plate count for nonalcoholic beverages ready to drink of 10 cfu/mL (FDA, 2013), the shelf-life of mixed beverage processed (by HHP and thermally) and untreated was 8 weeks (56 days) and 5 weeks (35 days), respectively. Thus, it is possible to state that high-pressure processing increased the shelf-life of untreated mixed beverage in 3 weeks (19 days) (Figure 3A). The same effect of HHP treatment on extending shelf-life of fruit products was noticed by Varela-Santos et al. (2012).

Coliforms (cfu.mL⁻¹), analyzed in samples of mixed beverage treated by HHP and by thermal pasteurization right after processing and during 8 weeks (56 days) of storage at 4 °C, remained non detectable (ND) from the beginning to the end of the storage period, attending the microbiological quality standard for juices ready to drink (BRASIL, 2001). This result indicates that HHP processing ensured microbial safety as well as traditional thermal pasteurization.

The results obtained in the physicochemical analyses of the mixed beverage samples (untreated, treated by HHP at 250 MPa and 25 °C for 1 min and thermally pasteurized) throughout storage period at 4 °C can be viewed in Figure 4. High-pressure processed beverage presented physicochemical parameters close to the untreated beverage in the day of processing (time zero) while thermal pasteurized showed greater differences from original physicochemical characteristics of the untreated mixed beverage.

The pH of mixed beverages, processed and untreated, remained between 2.57 and 2.86 (Figure 4A). At the end of storage time (56 days) the pH of the beverages was slight lower than at the beginning (time zero). Right after processing, the beverage processed by HHP had pH similar to the untreated, while the pH of the thermally pasteurized beverage was significantly lower than others ($p \leq 0.05$).

The parameters pH and TA showed a negative correlation ($p \leq 0.05$), in other words, they had an inverse correlation (Table 2).

Table 2 - Multiple correlation analysis of physicochemical parameters on HHP processed lemongrass-lime mixed beverage.

	pH	TA	Vitamin C	Phenolic	DPPH
pH	-	-0,38*	-0,06	-0,07	-0,08
TA		-	0,02	-0,05	0,04
Vitamin C			-	0,98**	0,98**
Phenolic				-	0,93**
DPPH					-

*Significant at $p \leq 0.05$; **Significant at $p \leq 0.01$.

The TA determines de total concentration of organic acids in the mixed beverage, mostly the citric acid provided by the lime juice. Thus, the higher is the citric acid concentration, higher the TA and lower the pH of the mixed beverage. In concordance with this statement, the TA of recently thermally pasteurized beverage was higher than the untreated. Some acid compounds could have been released and solubilized by thermal pasteurization due to the high temperature (72 °C). Processed beverages (by HHP and thermal pasteurization) presented TA approximately constant with no significant change during 8 weeks of storage (Figure 4B). Meanwhile, TA of untreated beverage increased along the storage, probably as a consequence of its high microbial counting, as shown in Figure 3.

High-pressure processed beverage had °Brix (%) similar to the untreated beverage and lower than the thermally pasteurized in the day of processing (Figure 4C). The high temperature of thermal pasteurization (72 °C) combined with the acidic pH may have catalyzed the sucrose hydrolysis (ZURITA, 2008), increasing the sugar solubility and the total soluble solids content (°Brix) of the mixed beverage (CHEFTEL, 1992). The °Brix (%) values had just a slight variation along the cold storage and at the end no differences were found between untreated, treated by HHP and thermally pasteurized beverages.

Regarding to vitamin C, the HHP treatment caused no significant change, that is, the mixed beverage retained 100% of the vitamin C content of the untreated beverage right after HHP processing (time zero) (Figure 4D). Conversely, thermally pasteurized mixed beverage retained only 79% of the original content of vitamin C. However, vitamin C content of the three beverages (untreated, HHP processed and thermally pasteurized) decreased drastically along storage. In 3 weeks (21 days), the vitamin C content of HHP processed beverage decreased 80.6% and in 5 weeks (35 days), beverages processed and untreated, had lost 87% of vitamin C compared to the untreated beverage recently prepared, indicating that the effect of other factors (such as presence of residual oxygen, exposure to light and enzymes) can overcome the effect of treatment. This emphasizes that the HHP treatment is not able to ensure vitamin C retention in the beverage without measures to avoid chemical degradation during storage.

Medina-Meza et al. (2015) also had greater vitamin C retention in HHP processed (70-80%) than in thermally treated (30%) spinach sauce. They verified significant losses of vitamin C only during the first week of storage for HHP and higher vitamin C retention was observed when lower pressure was applied (80% of initial value at the end of the storage period of 21 days). Martínez-Flores et al. (2015) had 100% of vitamin C retention in carrot juice treated by ultrasound at 58 °C, packaged in sealed air free plastic bags and stored during 20 days at 4 °C without exposure to direct light.

According to Gregory (2010), vitamin C is susceptible to oxidation and its stability much depends on composition of food and conditions of storage. In this context, the degradation rate is determined by light, temperature, concentration of oxygen, metal ions and pH. Oey et al. (2008) confirm that the oxygen plays an important role in the degradation of vitamin C in high-pressure treated food products during subsequent storage. According to the authors, the vitamin C degradation can be limited by lowering the initial oxygen concentration, that is to say, the stability of vitamin C after high-pressure processing is dependent on the molar ratio of vitamin and oxygen concentrations.

Right after processing, the phenolic content of HHP processed beverage was similar to the untreated and higher than thermally pasteurized beverage ($p \leq 0.05$) (Figure 4E). The phenolic content of beverage processed by HHP decreased quickly in the first week of storage (18.65%), than continued decreasing slowly until 70% of the original quantity and stabilized with 4 weeks of storage. From this point, the phenolic content of HHP was constantly higher than the thermally pasteurized and untreated beverage until complete 8 weeks of storage. The phenolic content of both thermally pasteurized and untreated beverage decreased in 3 weeks

of storage to a same level (61% of the original quantity), lower than HHP. Then, the thermally pasteurized beverage stabilized at this level and maintained the same phenolic content until the end of the storage period while untreated continue decreasing slowly.

In research conducted by Patras et al. (2009), ascorbic acid and phenolic levels of strawberry purées also were significantly higher for high-pressure processed samples as compared to thermally pasteurized samples. Total phenolic, as well as ascorbic acid, remained practically stable in carrot juice sonicated at 58 °C during 20 days of storage at 4°C (MARTÍNEZ-FLORES et al. 2015). These reinforces that, additionally to nonthermal treatment, other measures such as air free packaging and protection against light can contribute to a better retention of the bioactive compounds.

High-pressure processed and untreated beverages which had higher content of vitamin C and phenolic at the beginning (time zero) also had greater antioxidant capacity than thermally pasteurized (Figure 4F). The initial antioxidant capacity dropped drastically (74%) in 3 weeks of storage and decreased slight more until the end of the storage period. As presented in Table 2, the antioxidant capacity (DPPH) had a positive correlation ($p \leq 0.01$) with both vitamin C and phenolic content. This indicates that the antioxidant capacity of lemongrass-lime mixed beverage results from a combined effect of vitamin C and phenolic compounds. As phenolic compounds and ascorbic acid are natural antioxidants capable of scavenging the free radicals (MARTÍNEZ-FLORES et al. 2015), it would be expected that a reduction in this components decrease the antioxidant properties of the mixed beverage.

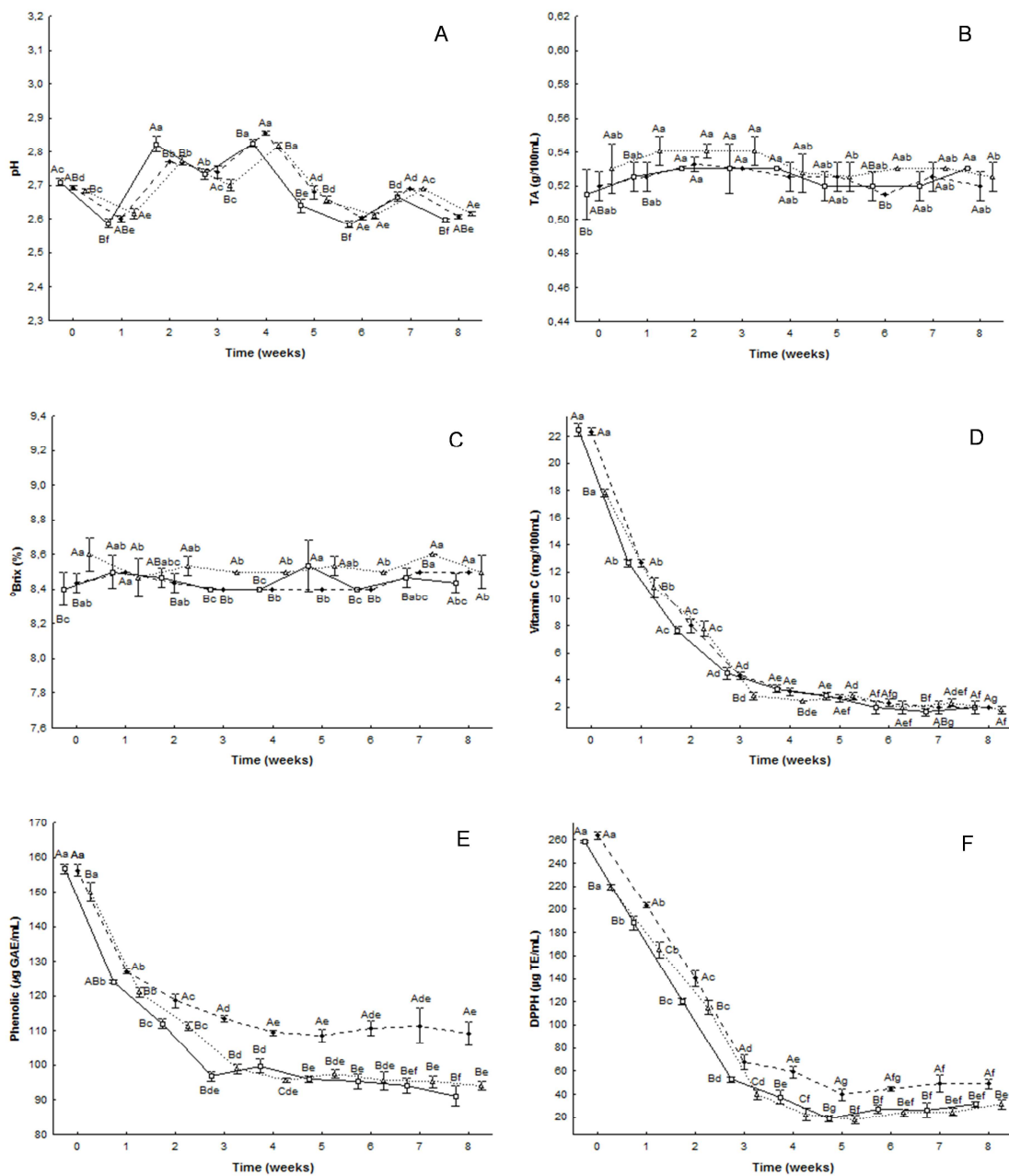


Figure 4 - Physicochemical parameters of lemongrass-lime mixed beverage during storage. Different letters (lowercase for time and uppercase for treatments) indicate statistical difference ($p \leq 0.05$) by *t* means test. \square Untreated; \blacklozenge HHP; \triangle Thermal pasteurization.

The color parameters of the mixed beverages, measured right after processing and during cold storage, are shown in Figure 5.

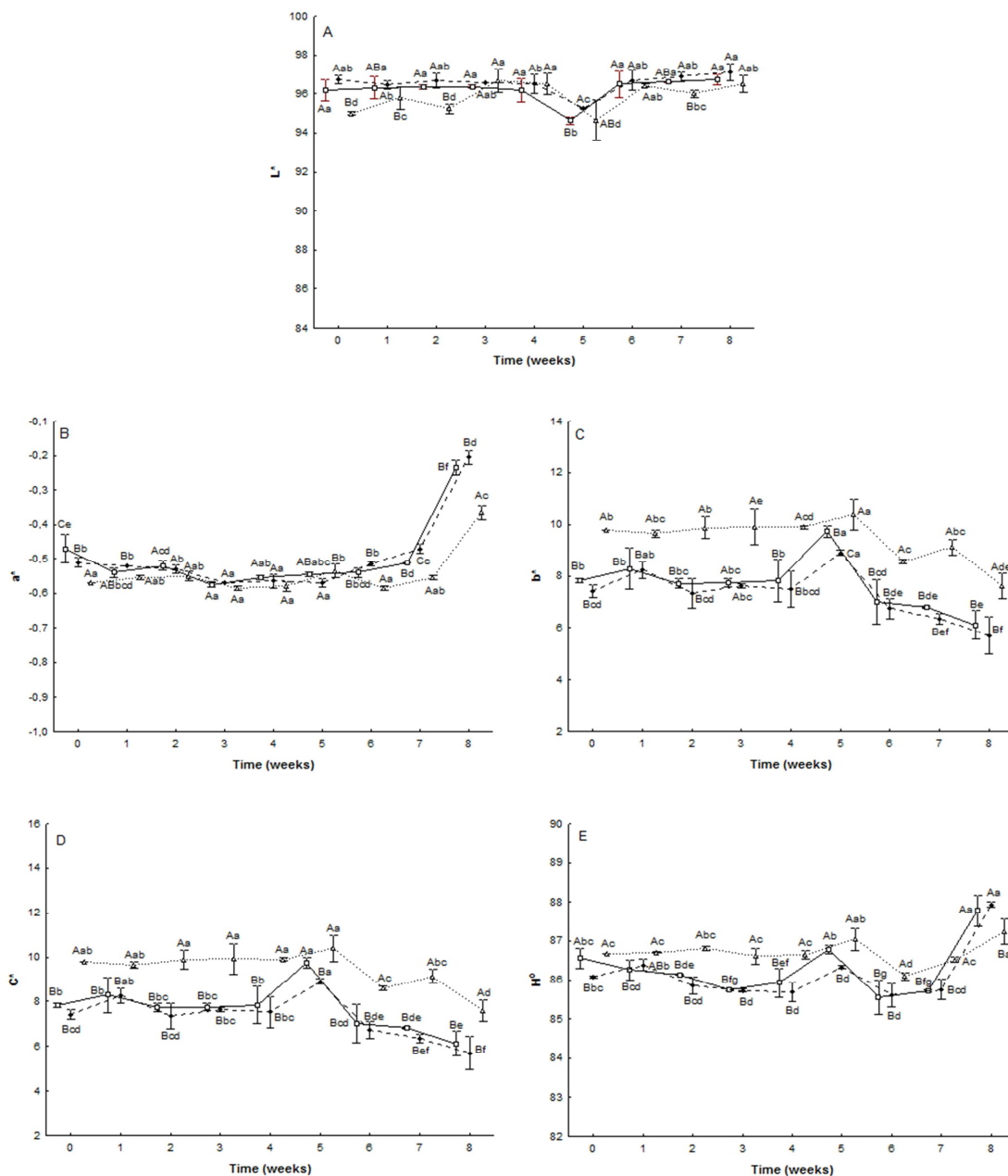


Figure 5 - Color parameters of lemongrass-lime mixed beverage after processing and during storage. Different letters (lowercase for time and uppercase for treatments) indicate statistical difference ($p \leq 0.05$) by t means test. \square Untreated; \blacklozenge HHP; \triangle Thermal pasteurization.

High-pressure treatment did not cause significant color change once the HHP processed mixed beverage presented values of color parameters L^* , a^* e b^* similar to untreated, right after processing and also along cold storage (Figure 5A, 5B and 5C). After

thermal pasteurization, the L^* component decreased (Figure 5A) and the yellow component (b^*) became more intense compared to untreated mixed beverage (Figure 5C), indicating that beverage color changed from light yellow to dark yellow.

Patras et al. (2009) reported better color retention in strawberry and blackberry purées treated by HPP than thermally pasteurized. Medina-Meza et al. (2015) observed the darkening of the spinach sauce color after both thermal and high-pressure treatments. Even though, in general, the high-pressure processed spinach sauce presented lower color differences compared to untreated sample than thermally pasteurized sauce.

All mixed beverages (untreated, HHP processed and thermally pasteurized) presented a decrease in the green (a^*) and yellow (b^*) components after 6 weeks of cold storage, indicating loss of color (Figure 5B and 5C). The color intensity (C^*) also decreased after the same period of storage (Figure 5D), confirming that a process of color degradation could have started in 6 weeks (42 days) of shelf-life. The hue values (H°) of mixed beverages remained close to yellow (90°) (Figure 5E). Even high-pressure processing at low temperatures is known to have limited effect on pigments, causing minimal alteration of the natural color of food and beverages, changes in color may occur during storage due to incomplete inactivation of enzymes and microorganisms. Degradation of pigments in several fruit systems may have been catalyzed by the presence of oxidase enzymes during or after processing (MEDINA-MEZA et al. 2015; PATRAS et al. 2009).

4. Conclusion

This study clearly demonstrate that high-pressure processing at pressure up to 250 MPa and 25 °C of temperature for a short time (1-2 min) do not affect the content of vitamin C and phenolic of untreated lemongrass-lime mixed beverage. Nonthermal treatment by HHP results in better retention of the original content of bioactive compounds and physicochemical quality characteristics of the mixed beverage in comparison with thermal pasteurization. High-pressure processing at 250 MPa and 25 °C for 1 min is able to ensure microbiological safety and to improve the microbiological quality and the shelf-life of untreated lemongrass-lime mixed beverage. Other measures concerning to preservation should be combined with high-pressure treatment to improve stability and ensure the retention of bioactive compounds as well as antioxidant capacity of lemongrass-lime mixed beverage until the end of shelf-life.

Acknowledgments

This study was carried out with the financial support of the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) (PDSE process Nr. 99999.003943/2015-01).

References

- AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1995. 1141 p.
- BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermo-sonication treatments. **Journal of Food Engineering**, v. 108, p. 383–392, 2012.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N. 19**. Complementa os padrões de identidade e qualidade das bebidas. 19 Jun 2013.
- BUTZ, P.; TAUSCHER, B. Emerging technologies: chemical aspects. **Food Research International**, v. 35, p. 279–284, 2002.
- CABRAL NETO, O.; ROSENTHAL, A.; GASPAR, A. Physicochemical modifications in fresh bovine meat resulting from high hydrostatic pressure. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 2, p. 91-100, 2011.
- CALDERÓN-MIRANDA, M.L.; BARBOSA-CANOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, p. 19–30, 1999.
- CASAGRANDE, R. et al. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 183–190, 2007.
- CHEFTEL, J.C. **Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos**. 4th ed. Zaragoza: Acribia, 1992. 399p.
- COSTA, A.S.G. et al. Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, p. 324-328, 2012.
- FAIRCHILD, T.M.; FOEGEDING, P.M. A proposed nonpathogenic biological indicator for thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1247-1250, 1993.
- FARKAS, D.F. A short history of research and development efforts leading to the commercialization of high-pressure processing of food. In: **High pressure processing of food: Principles, Technology and Applications**. Balasubramaniam, V.M., Barbosa-Canovas, G.V., Lelieveld, H.L.M., Eds.; Springer: New York, USA, 2016. p. 30-35.
- FDA. U.S. Food and Drug Administration. **Juice HACCP hazards and controls guidance**, 2004. Available in:

<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ucm072557.htm> (accessed on 18 May 2016).

FDA. Philippines Food and Drug Administration. **Revised guidelines for the assessment of microbiological quality of processed foods**, 2013. Available in: <http://www.fda.gov.ph/attachments/article/71149/Annex%20I%20-%20FC%202013-10%20Microbiological%20Standard%20for%20Processed%20Food.pdf> (accessed on 27 May 2016).

FIGUEIRINHA, A. et al. *Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. **Food Chemistry**, v. 110, p. 718–728, 2008.

FRANCOIS, K. et al. Environmental factors influencing the relationship between optical density and cell count for *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1503–1515, 2005.

GREGORY, J.F. Vitaminas. In: **Química de alimentos de Fennema**, 4th Edition; Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O.R., Eds.; Artmed: Porto Alegre, Brasil, 2010. pp. 366-374.

GUERRERO-BELTRÁN, J.A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. High hydrostatic pressure processing of peach puree with and without antibrowning agents. **Journal of Food Processing Preservation**, v. 28, p. 69-85, 2004.

GUERRERO-BELTRÁN, J.A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. High hydrostatic pressure processing of fruit and vegetable products. **Food Reviews International**, v. 21, p. 411–425, 2005.

HUTCHINGS, J.B. Food color and appearance. 2nd ed. Aspen Publishers: Maryland, USA, 1999. 610p.

JANDHYALA, M.; BARBOSA-CANOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Note: Retention of ascorbic acid, thiamin and pyridoxal after high hydrostatic pressure or thermal treatments. **Food Sci. Tech. Int.**, v. 8, n. 5, p. 303–308, 2002.

KIELING, D.D.; PRUDENCIO, S.H. Development of Concentrates for the Preparation of Lemongrass-Lime Mixed Beverage: Physicochemical, Antioxidant and Sensory Properties. (unpublished; manuscript in preparation).

LUZIA, D.M.M.; JORGE, N. Antioxidant activity of lemon seed extract (*Citrus limon*) added to soybean oil in accelerated incubator-storage test. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 946-949, 2009.

MACHADO, T.F. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial do capim limão (*Cymbopogon citratus*) e sua interação com os componentes dos alimentos. **B.CEPPA**, v. 33, n. 1, p. 30-38, 2015.

MARQUES V, FARAH A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370–1376, 2009.

MARTÍNEZ-FLORES, H.E. et al. Physico-chemical parameters, bioactive compounds and microbial quality of thermo-sonicated carrot juice during storage. **Food Chemistry**, v. 172, p. 650–656, 2015.

- MEDINA-MEZA, I.G. et al. Effects of thermal and high pressure treatments in color and chemical attributes of an oil-based spinach sauce. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 86-94, 2015.
- MENDONÇA, L.M.V.L. et al. Chemical composition and Tahiti lime industrial residues output characterization. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 4, p. 870-874, 2006.
- MIRHOSSEINI, H. et al. Optimization of the contents of Arabic gum, xanthan gum and orange oil affecting turbidity, average particle size, polydispersity index and density in orange beverage emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1212-1223, 2008.
- OLIVEIRA, A.C.G. et al. Effects of heat treatment and gamma radiation on the characteristics of pure sugarcane juice and mixed with fruit juices. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 4, p. 863-873, 2007.
- PATRAS, A. et al. Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 308–313, 2009.
- RAUT JS, KARUPPAYIL SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.
- SANCHO, F. et al. Effect of ultra-high hydrostatic pressure on hydrosoluble vitamins. **Journal of Food Engineering**, v. 39, p. 247-253, 1999.
- SAUCEDO-REYES, D. et al. Modeling survival of high hydrostatic pressure treated stationary and exponential-phase *Listeria innocua* cells. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 135-141, 2009.
- SILVA, M.A.L. et al. Evaluation of the chemical composition of *Cymbopogon citratus* Stapf growing in environments with different pollution levels and the influence on tea composition. **Acta Scientiarum**, v. 32, n. 1, p. 67-72, 2010.
- SILVA-ANGULO, A.B. et al. Comparative Study of the Effects of Citral on the Growth and Injury of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* Cells. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1-13, 2015.
- VARELA-SANTOS, E. et al. Effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on physicochemical properties, bioactive compounds and shelf-life of pomegranate juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 13, p. 13 – 22, 2012.
- VELÁZQUEZ-ESTRADA, R.M. et al. Impact of ultra high pressure homogenization on pectin methylesterase activity and microbial characteristics of orange juice: A comparative study against conventional heat pasteurization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 13, p. 100 –106, 2012.
- WANG, C.Y. et al. Recent Advances in Food Processing Using High Hydrostatic Pressure Technology. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, p. 527-540, 2016.
- ZURITA, E.J.C. **Avaliação da inversão da sacarose em um sistema de evaporação (evaporador de filme descendente com promotor de película)**. 2008. 92p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ARTIGO CIENTÍFICO 3

Evaluation of the Attributes of Physicochemical and Sensory Quality of a New Soy-based Beverage with Lemongrass and Lime Juice

Dirlei Diedrich Kieling, Sandra Helena Prudencio*

Food Science and Technology Department, State University of Londrina, Londrina, PR, 86057-970, Brazil. *Corresponding author: sandrah@uel.br Tel./fax: +55 43 3371 4080

ABSTRACT

The objective of this work was to study the influence of the addition of soymilk on physicochemical characteristics, antioxidants properties and acceptance of lemongrass-lime mixed beverages. For this purpose, the commercial soymilk powder with highest total isoflavones content (among four commercial brands) was selected and soy-based beverages with lemongrass, lime juice and soymilk were formulated. The beverages were characterized by physicochemical, color and sensory analysis. Soy-based beverages showed differences in pH, ratio and color compared to mixed beverages without soy. The addition of soymilk to the lemongrass-lime mixed beverages increased the total phenolic content and the antioxidant capacity against ABTS free radicals. In the soy-beverages, the presence of lemongrass aqueous extract increased the antioxidant capacity against DPPH free radicals. Sensory analysis showed that the soy-based beverages had good acceptance and pleasant aroma and flavor. The new soy-based beverage developed can be considered a viable source of bioactive compounds to the consumers.

Keywords: Beverages, bioactive compounds, phenolic, isoflavones, antioxidants, acceptance.

1. Introduction

The physiological processes that take place in many plants lead to the formation of bioactive compounds that can benefit human health. The isoflavones, polyphenols found in soybean, have been one of the most investigated bioactive compounds that can benefit human health due to their biological activities in vivo, such as to reduce the incidence of some types of cancer, to relieve climacteric symptoms in postmenopausal women, controlling diabetes

mellitus and osteoporosis and preventing cardiovascular diseases (LIMA; IDA, 2014; MESSINA; LANE, 2007; GÓES-FAVONI et al., 2004; ESTEVES; MONTEIRO, 2001). It seems that the mechanisms of action of isoflavones depend on their estrogen agonist-antagonist properties and other biochemical properties, such as enzymatic activity inhibition and antioxidant effects (ESTEVES; MONTEIRO, 2001).

Even with their great nutritive value and beneficial properties, soy based food products have not been well accepted in western countries due to its undesirable flavor and taste. The characteristic flavors of beany and rancid are caused by lipoxygenases enzymes, while the characteristic astringency and bitter taste are due to the isoflavones and the saponins, respectively. Several technological processes and genetic breeding have been used to improve the sensory characteristics. It was observed a reduction in beany flavor and aroma of products made with soybeans lipoxygenase-free (SILVA et al., 2010).

Soy-based beverages during some time were associated with slightly pronounced flavor (MENDONÇA, 2010). However, these products become attractive to the general population, because they are considered a healthy food alternative, lactose-free (BENASSI; BENASSI; MANDARINO, 2012), low in saturated fat, devoid of cholesterol and that provide soy protein (MESSINA; LANE, 2007). With the flavor improvement, by adding flavoring and fruit juices, the consumption of soy-based beverages has grown in the last decade in Brazil and worldwide (BENASSI; BENASSI; MANDARINO, 2012).

Callou (2009) found a positive correlation between total phenolic and antioxidant capacity by DPPH method to both soy-based beverages, flavored and with fruit juices. The analysis of the composition of twelve commercial soy-based beverages demonstrated that the main antioxidants present were the phenolic compounds from fruits, soy isoflavones, vitamin C and synthetic antioxidants. Costa et al. (2012) stated that total phenolic are the main antioxidant compounds of mixed beverages containing fruits juices, tea/herbs and vegetables extracts, followed by ascorbic acid, naturally present or intentionally added to the beverages.

According to Martins et al. (2013), antioxidants are substances that protect the tissues from damage caused by free radicals that are produced during aerobic respiration by incomplete reduction of oxygen and are directly associated with many diseases such as hypertension, cancer, sclerosis and aging. The human organism has the ability to inhibit the action of free radicals via regulatory enzymes. However, as this regulatory system is not completely effective, the intake of antioxidant compounds may contribute to the neutralization of free radicals.

Kieling and Prudencio (unpublished data, Artigo 1) developed lemongrass-lime mixed beverages with good sensory and physicochemical quality, containing bioactive compounds (vitamin C and phenolic) that conferred to the product important antioxidant properties. The addition of lemongrass aqueous extract and essential oil enriched the aroma and flavor, making the mixed beverage sensory pleasant and well accepted by the potential consumers.

Thus, the objective of this work was to study the influence of the addition of soymilk on physicochemical characteristics, antioxidants properties and acceptance of lemongrass-lime mixed beverages. For this purpose, a commercial soymilk powder was selected, based on its total isoflavones content, and soy-based beverages with lemongrass, lime juice and soymilk were formulated.

2. Material and Methods

2.1 Material

The lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) was grown at the State University of Londrina (Londrina, Paraná, Brazil) and harvested after 60 days of cultivation. Fresh Tahiti lime fruit, soymilk powder, xanthan gum and sucrose were obtained from reliable commercial sources. All chemicals used in the analysis were of analytical or liquid chromatography grade. The Gallic acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 2 N, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), ABTS (2,2'-azinobis-3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), aglycones and β -glucosides were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The 6''-O-acetylglucosides and 6''-O-malonylglucosides were obtained from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan).

The research project was approved by the Ethics Committee for Research Involving Human Beings of the State University of Londrina (CEP/UEL N. 235/2013 and CAAE N. 24537713.0.0000.5231). All procedures were performed according to the principles of good manufacturing practices (BRASIL, 1997) and food safety (CODEX ALIMENTARIUS, 2003), and the beverages were safe for consumption.

2.2 Preparation of the beverages

Two mixed beverages formulations with lemongrass, lime juice and soymilk (F1 and F2), herein after called "soy-based beverages", and two mixed beverages formulations with lemongrass and lime juice (F3 and F4), without soy, were prepared as shown in Table 1. The

formulations had the purpose of studying the influence of the addition of soymilk on physicochemical parameters, antioxidants properties and acceptance of the mixed beverage with lemongrass and lime juice. One formulation of soy-based beverage (F5) without lemongrass was also prepared (Table 1), aiming to evaluate the effect of the soymilk on physicochemical parameters and antioxidant properties in the absence of lemongrass.

Table 1 - Formulations of the mixed beverages.

Formulation	LAE (mL.L ⁻¹)	LLE (g.L ⁻¹)	LEOE (g.L ⁻¹)	SP (g.L ⁻¹)	TLJ (g.L ⁻¹)	Sucrose (g.L ⁻¹)	Xanthan (g.L ⁻¹)
F1	50	-	1.25	16	90	80	2
F2	-	0.52	2.50	16	90	80	2
F3	50	-	1.25	-	90	80	2
F4	-	0.52	2.50	-	90	80	2
F5	-	-	-	16	90	80	2

LAE = Lemongrass aqueous extract; LLE = Lemongrass lyophilized extract; LEOE = Lemongrass essential oil emulsion; SP = soymilk powder; TLJ = Tahiti lime juice.

The lemongrass derivatives LAE (lemongrass aqueous extract) and LLE (lemongrass lyophilized extract), used as ingredients in the formulations, and LEO (lemongrass essential oil), used in the preparation of the LEOE (lemongrass essential oil emulsion), were obtained from fresh lemongrass leaves as described by Kieling and Prudencio (Unpublished data; Artigo 1). The LLE (moisture content of 5.58 ± 0.12 g.100 g⁻¹) was added in equivalent amount to the LAE (total solid content of 1.00 ± 0.01 g.100 mL⁻¹). The LEOE, used in the beverages formulations with the purpose of improving the lemongrass aroma and flavor, was prepared with LEO, xanthan gum and water (1:1:48 g:g:mL) using a ultra turrax® (IKA®, Staufen, Germany). The aqueous phase xanthan-water was prepared first, according to Mirhosseini et al. (2008) recommendation. Then, the LEO was gradually added to the aqueous phase and the mixture was homogenized at 5000 rpm for 5 minutes to obtain a stable dispersion. The proportion of LAE, LLE and LEOE added was based on the study of Kieling and Prudencio (Unpublished data; Artigo 1), with some adjustment. A higher amount of LEOE was used in the formulations F2 and F4 to compensate the losses of aroma and flavor of the LLE.

The amount of soymilk powder added (16 g.L⁻¹) was defined based on the standard of identity and quality of mixed beverage with soy (BRASIL, 2013), which establishes a

minimum amount of soy protein of 0.5% (w/v). To calculate the amount of soymilk powder to be used in the soy-based beverages formulations it was considered the total protein content determined by Kjeldahl (AOAC, 1995), which was 37.5 g of protein per 100 g of product.

The soymilk powder was selected from four commercial samples of soymilk (37 – 43 g of protein per 100 g of soymilk), using as criteria for choosing the content of total isoflavones. The total isoflavones content was determined by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) in the UPLC[®] equipment (Acquity UPLC[®] System, Waters, MA, USA). The chromatographic analysis was performed as described by Lima and Ida (2014). Then, the soymilk powder with the highest content of isoflavones (485 mg.100 g⁻¹, $p \leq 0.05$) was selected as an ingredient of the soy-based beverage formulations.

The TLJ (Tahiti lime juice) was obtained in the following way: Fresh Tahiti limes were washed and sanitized with chlorine solution (150 mg.L⁻¹). After this, fruits were cut into halves and the juice was extracted using a manual extractor. The solid particles were then separated out using cheese cloth. The amount of TLJ added was based on the study of Pedrão et al. (1999), with some modification. The proportion of sucrose was defined by a preliminary Rank preference test (KIELING; PRUDENCIO, Artigo 1) that was conducted according to Meilgaard et al. (1999, p.241). The concentration of xanthan gum (2g.L⁻¹) was determined on preliminary physicochemical tests (results not shown).

For each formulation (Table 1), the ingredients were weight, suspended in purified water and then the mixture was homogenized using a blender. Right after preparation, the five mixed beverages formulations (F1, F2 and F5 with soy, F4 and F3 without soy) were physicochemically and chemically analyzed with respect to pH, total soluble solids, total acidity, color, vitamin C, total phenolic and antioxidant capacity. The samples were centrifuged (Eppendorf centrifuge 5804R, Hamburg, Alemanha) at 2500 g and 10 °C for 10 min before the physicochemical analyses, with exception to color and pH determination. The two formulations of soy-based beverages with lemongrass and lime juice (F1 and F2) were also submitted to sensory analysis.

2.4 pH, acidity and Brix

The pH of the mixed beverages (F1, F2, F3, F4 and F5) was determined by direct reading of samples using a pH meter (Hanna Instruments Inc., Woonsocket, RI, USA). The total acidity (TA) was determined by titration according to AOAC (1995) and expressed as g citric acid.100 mL⁻¹. The total soluble solids content (°Brix) was determined using digital

refractometer (Pocket Pal-1, Atago, Tokyo, Japan). The ratio was calculated by dividing the total soluble solids ($^{\circ}$ Brix) by the TA (g citric acid.100 mL⁻¹).

2.5 Color

The color parameters a* (red-green) and b* (yellow-blue) of the mixed beverages were assessed using a colorimeter Minolta® CR-300 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) equipped with a standard illuminant D65 and observer at 10°. The instrument was previously calibrated using a white reference plate.

2.6 Ascorbic acid

The ascorbic acid (vitamin C) content of the mixed beverages was quantified by 2,6-dichlorophenol-indophenol titration method (AOAC 1995) using an extracting solution of metaphosphoric acid-acetic acid. Results were expressed as mg ascorbic acid.100 mL⁻¹.

2.7 Total phenolic compounds

Total phenolic contents of the mixed beverages were determined by the Folin-Ciocalteu colorimetric method, as described by Costa et al. (2012). The total phenolic contents were quantified based on a standard curve of gallic acid and the results expressed as μ g of gallic acid equivalents (GAE) per mL (μ g GAE.mL⁻¹).

2.8 Antioxidant capacity

The antioxidant capacity of the mixed beverages was determined by DPPH and ABTS scavenging assay. The antioxidant capacity against the radical DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) was determined according to Brand-Williams et al. (1995), with some modifications (CASAGRANDE et al., 2007). The antioxidant capacity against the free radical ABTS•⁺ (2,2 azinobis 3- ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) was determined using the method of Sanches-Gonzales et al. (2005). A control was prepared in both tests containing all reagent solutions, except the sample. The antioxidant capacity was quantified based on a standard curve of Trolox and the results were expressed as μ g of Trolox equivalent (TE) per mL (μ g TE.mL⁻¹).

2.9 Acceptance of attributes

The acceptance test of attributes of the soy-based beverages was carried out with 86 individuals (45 women and 41 men), of whom 75.58% aged 15-25 years old, 18.61% aged 26-35 years and 5.81% aged 36-50 years. All of them were regular consumers of fruit juices (100%), but only 13.95% consume soy-based beverages frequently (1-4 times a week), 65.12% consume rarely (less than once a week) and 20.93% never consume soy-based beverages.

The two formulations of soy-based beverages with lemongrass and lime juice (F1 and F2) were prepared on the day of the sensory analysis and maintained at $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. The acceptance test was performed in individual booths under white light. Samples (30 mL) were served at $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ in transparent plastic cups coded with three-digit random numbers. The two soy-based beverages were presented simultaneously, in randomized order and evaluated for its appearance, aroma, flavor, texture and global acceptance, using a hedonic 9 points structured scale (1 = Dislike extremely; 9 = Like extremely) (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999, p.241).

2.10 Statistical Analysis

The results obtained in the physicochemical determinations were submitted to one-way ANOVA (formulations) and Principal Component Analysis (PCA). The data obtained in the acceptance test were analyzed by two-way ANOVA (formulations and assessors). Differences between formulations were determined by Tukey's means test ($p \leq 0.05$). The statistical analyses were performed using Statistica 7 software (STATSOFT, 2006).

3. Results and Discussion

3.1 Physicochemical parameters of the beverages

The soy-based beverages showed total isoflavones content of 14.73 mg per 200 mL of beverage (calculated from the total isoflavones content of the soymilk powder). According to Callou (2009) to obtain the health benefits associated with regular consumption of soy, should be ingested an amount of 50 mg of isoflavones per day. Thus, the consumption of two cups of the soy-based beverage per day would provide about 30 mg of isoflavones (60% of the daily requirement) indicating that the soy-based beverage formulated could represent an important source of isoflavones to the diet.

The graphical representation of the principal component analysis (PCA) of the physicochemical quality parameters of the mixed beverages is shown in Figure 1. The first two principal components in the PCA (PC1 and PC2) were considered by presenting eigenvalues ≥ 1 according to Kaiser Criterion and by explaining the majority (94.98%) of the total variability contained in the original variables (LAWLESS; HEYMANN, 2010, p.245).

The parameters that presented a correlation coefficient with the principal component equal or greater than 0.6 (in absolute value) were considered important (MARCHI et al., 2012). Then, the parameters pH, ratio, vitamin C, ABTS (positive correlation) and b^*/a^* (negative correlation) contributed to the explanation of the PC1 while total phenolic and DPPH (negative correlation) contributed to the explanation of the PC2 (Figure 1a).

The PCA indicated the similarities and differences between the mixed beverages formulations and the physicochemical parameters that most characterize them. The PC1 separated the mixed beverages formulations with soy (F1, F2 and F5) from the formulations without soy (F3 and F4) (Figure 1b). The formulations with soy (on the right) were characterized by the parameters phenolic, ABTS, ratio, pH and vitamin C; while the formulations without soy (on the left) were characterized by the parameters DPPH and b^*/a^* (Figure 1a and 1b). This indicates that the addition of soymilk resulted in mixed beverages with different physicochemical and antioxidant characteristics. Furthermore, the PC2 separated the mixed beverages formulations with LAE - aqueous extract (F1 and F3) from the formulations with LLE – lyophilized extract (F2 and F4) (Figure 1b). Thus, the formulations with LAE (underside) were characterized by the parameters total phenolic, DPPH, ABTS, ratio, pH and b^*/a^* ; while the formulations with LLE (upside) were characterized by the parameter vitamin C (Figure 1a and 1b).

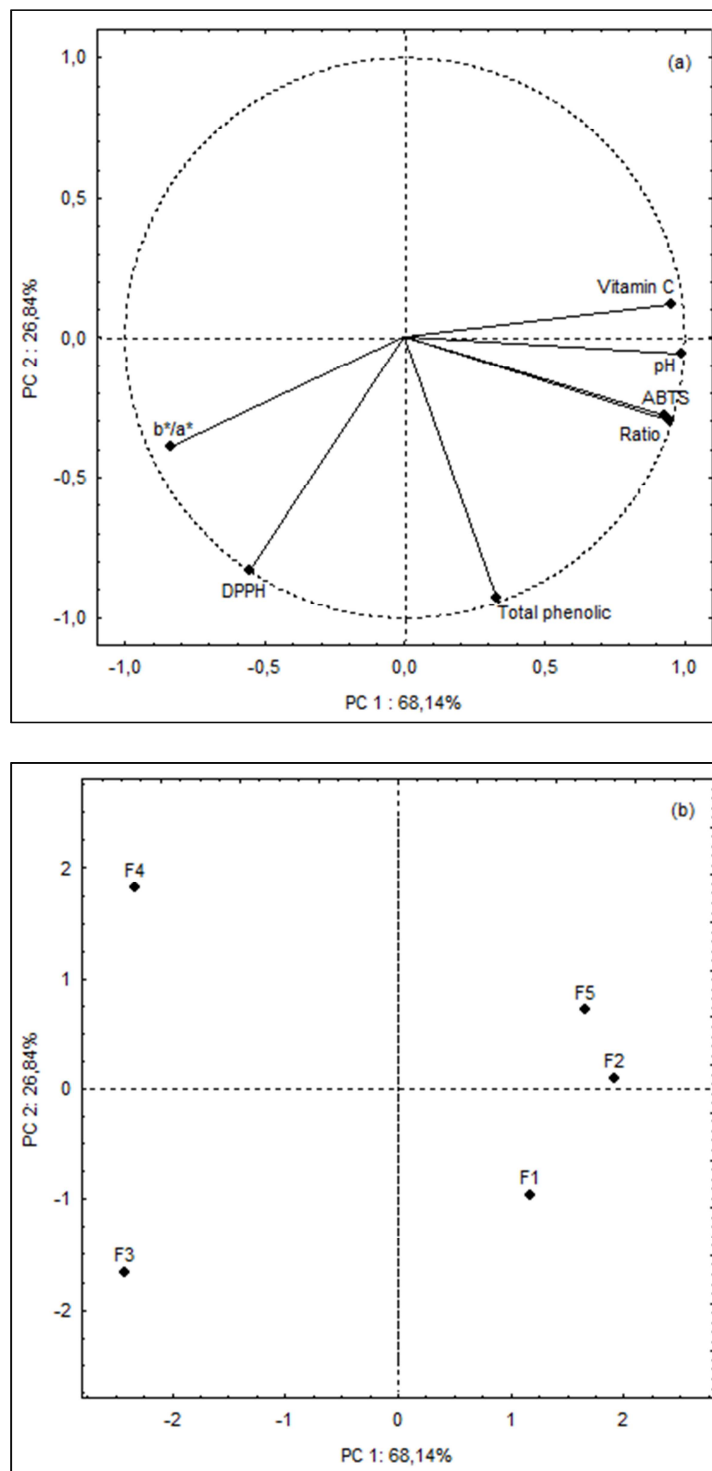


Figure 1 - Principal components analysis for physicochemical parameters (vectors) and beverages formulations (F). F1: LAE + LEOE + SP; F2: LLE + LEOE + SP. F3: LAE + LEOE; F4: LLE + LEOE; F5: SP; All formulations contain: TLJ + sucrose + xanthan. LAE = Lemongrass aqueous extract; LLE = Lemongrass lyophilized extract; LEOE = Lemongrass essential oil emulsion; SP = Soymilk powder; TLJ = Tahiti lime juice.

The values of physicochemical quality parameters and a comparison between the formulations of the mixed beverages by Tukey means test ($p \leq 0.05$) are shown in Table 2. The three formulations of soy-based beverages (F1, F2 and F5) presented higher pH and ratio than the mixed beverages (F3 and F4) without soy. This occurred because the soymilk powder increased the total soluble solid content ($^{\circ}\text{Brix}$) and decreased the total acidity (TA), thereby increasing the ratio ($^{\circ}\text{Brix}/\text{TA}$) and the pH of the mixed beverages. Besides, the soymilk pure diluted in water (16 g.L^{-1}) presented pH of 7.13 ± 0.06 . Even so, all the mixed beverages presented low pH due to the addition of lime juice.

It should be emphasized that the undesirable behavior of reduction of the solubility and precipitation of the soy protein, caused by the acidity of the mixed beverages, was remedied by the use of xanthan gum, whose stabilizer and suspending effect are known (BEMILLER; HUBER, 2010). Besides that, the xanthan gum also has the advantage of being soluble in water at ambience temperature, soluble and stable at low pH and its solutions do not become thicker when cooled down. The proportion of xanthan gum used in the formulations of mixed beverages (0.2% w/v) conferred the expected effect of delaying the phase separation without excessively increasing the viscosity of the mixed beverages.

The five mixed beverages showed the same vitamin C content (Table 2) as expected, since its major source was the lime juice, added in the same quantity in all formulations. The vitamin C values found in the mixed beverages formulated are lower than those reported by Callou (2009) to commercial soy-based beverages and by Costa et al. (2012) to commercial mixed beverages containing different components. According to the authors, besides the ascorbic acid naturally present in fruit juices, more ascorbic acid is intentionally added to the beverages by manufactures to protect the final product from oxidation.

Table 2: Physicochemical characteristics of the mixed beverages.

Parameters	Formulations				
	F1	F2	F3	F4	F5
pH	3.34 ± 0.01 ^a	3.34 ± 0.01 ^a	2.93 ± 0.01 ^b	2.93 ± 0.01 ^b	3.35 ± 0.01 ^a
TA (g citric acid.100mL ⁻¹)	0.45 ± 0.01 ^b	0.45 ± 0.01 ^b	0.48 ± 0.00 ^a	0.48 ± 0.01 ^a	0.45 ± 0.01 ^b
°Brix (%)	10.47 ± 0.06 ^a	10.53 ± 0.06 ^a	10.10 ± 0.00 ^c	9.70 ± 0.00 ^d	10.27 ± 0.06 ^b
Ratio (°Brix/TA)	23.06 ± 0.36 ^a	23.42 ± 0.44 ^a	21.19 ± 0.16 ^b	20.27 ± 0.40 ^b	22.72 ± 0.44 ^a
Vitamin C (mg AA.100mL ⁻¹)	2.60 ± 0.03 ^a	2.63 ± 0.03 ^a	2.56 ± 0.05 ^a	2.56 ± 0.05 ^a	2.63 ± 0.03 ^a
a*	-1.43 ± 0.01 ^a	-0.36 ± 0.11 ^c	-0.34 ± 0.08 ^{cd}	-0.55 ± 0.04 ^b	-0.18 ± 0.06 ^d
b*	3.23 ± 0.05 ^c	0.62 ± 0.08 ^d	9.76 ± 0.56 ^a	6.91 ± 0.21 ^b	1.01 ± 0.06 ^d
b*/a*	-2.26 ± 0.03 ^c	-1.77 ± 0.36 ^c	-30.19 ± 8.02 ^a	-12.55 ± 1.29 ^b	-6.10 ± 2.54 ^{bc}
Phenolic (µg GAE.mL ⁻¹)	22.11 ± 0.80 ^a	19.54 ± 0.34 ^b	20.76 ± 0.11 ^b	13.07 ± 0.48 ^d	16.63 ± 0.24 ^c
DPPH (µg TE.mL ⁻¹)	109.37 ± 2.07 ^b	87.02 ± 3.24 ^c	140.35 ± 2.56 ^a	89.37 ± 3.24 ^c	81.53 ± 4.44 ^c
ABTS (µg TE.mL ⁻¹)	381.89 ± 18.36 ^a	387.44 ± 25.46 ^a	320.78 ± 17.11 ^b	267.44 ± 21.43 ^d	407.44 ± 13.47 ^a

Different lowercase letters in the same line indicate statistical difference ($p \leq 0.05$) by Tukey's means test. F1: LAE + LEOE + SP + TLJ + sucrose + xanthan; F2: LLE + LEOE + SP + TLJ + sucrose + xanthan; F3: LAE + LEOE + TLJ + sucrose + xanthan; F4: LLE + LEOE + TLJ + sucrose + xanthan; F5: SP + TLJ + sucrose + xanthan. LAE = Lemongrass aqueous extract; LLE = Lemongrass lyophilized extract; LEOE = Lemongrass essential oil emulsion; SP = soymilk powder; TLJ = Tahiti lime juice.

With respect to the color parameters, the formulations with soy (F1, F2 and F5) presented the same proportion of yellow in relation to green (b^*/a^*), though the one with LAE (F1) had green ($-a^*$) and yellow (b^*) color parameters more intense than others. The formulations of mixed beverage without soy (F3 and F4), presented higher proportion of yellow in relation to green (b^*/a^*) than the formulations with soy; the formulation F3, with LAE – aqueous extract, had the most intense yellow parameter (b^*) among all formulations.

The addition of soymilk to the mixed beverages formulations F3 and F4, obtaining the soy-based beverages with lemongrass and lime juice F1 and F2, respectively, increased the total phenolic content. Besides, the mixed beverages formulations with LAE – aqueous extract presented higher total phenolic content than the ones with LLE – lyophilized extract (F1 > F2 and F3 > F4). Among all the mixed beverages formulations, the formulation with soymilk and LAE (F1) showed the highest phenolic content.

In previous study (KIELING; PRUDENCIO, Artigo 1) the LAE exhibited total phenolic content higher than the LLE, indicating that may have been losses of phenolic compounds or changes in the solubility (aqueous extractability) of some compounds due to the freeze-drying process. Therefore, the mixed beverages with LAE presented higher total phenolic content than the ones with LLE. The major phenolic compounds found in an aqueous solution obtained from lemongrass leaves were the phenolic acids, then flavonoids and tannins (FIGUEIRINHA et al., 2008).

With respect to the antioxidant capacity, it was also verified that the formulations of mixed beverages with LAE – aqueous extract presented higher antioxidant capacity against DPPH free radicals than the ones with LLE – lyophilized extract (F1 > F2 and F3 > F4). This is probably related to the higher total phenolic content in the LAE than in the LLE and to the higher proportion of phenolic acids. Among the five mixed beverages, the formulation with LAE (F3) showed the highest antioxidant capacity against DPPH radicals, followed by the formulation with LAE and soymilk (F1).

The formulations of mixed beverage with soymilk (F1, F2 and F5) showed higher antioxidant capacity against ABTS free radicals than the ones without soy (F3 and F4). There was no significant difference on the antioxidant capacity against ABTS free radicals between the soy-based beverages F1 (with LAE - aqueous extract) and F2 (with LLE - lyophilized extract). However, when comparing the beverages without soy, it was verified that the formulation F3 (with LAE), presented higher antioxidant capacity against ABTS free radicals than F4 (with LLE).

In general, the presence of soymilk (mostly total isoflavones) and LAE (mostly phenolic acids) contributed positively to the total phenolic content and to the antioxidant capacity of the mixed beverage. Particularly, the presence of LAE in the mixed beverage contributed to the antioxidant capacity against DPPH free radicals while the presence of soymilk contributed to the antioxidant capacity against ABTS free radicals. This difference between DPPH and ABTS can be due to the differences in the phenolic compounds class/chemical structure associated with the principle of inactivation of each free radical.

In the DPPH assay, the antioxidant activity of compounds against the stable nitrogen radical DPPH[•] is determined. The DPPH[•] radical is reduced when reacts with hydrogen donors, such as phenolic compounds and ascorbic acid (COSTA et al., 2012). The interaction of a potential antioxidant with DPPH[•] depends on its structural conformation (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). According to the authors, certain compounds (ascorbic acid and phenolic acids) react quick and efficiently with the DPPH[•] reducing a number of DPPH[•] molecules equal or higher than the number of available hydroxyl groups. Then, it can be assumed that the highest antioxidant capacity of the formulation F3 against DPPH[•] radical is justified by its higher proportion of phenolic acids. However, other compounds have a mechanism of reaction slower, more complex and less effective (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Additionally, the presence of some compounds in formulations may cause interference with the method of antioxidant activity evaluation (MARQUELE et al., 2005). Therefore, it is possible that the addition of soymilk interfered in the mechanism of reaction and, apparently, in the antioxidant capacity of the mixed beverages against DPPH[•] radical.

In the ABTS test, the antioxidant activity is measured by the ability of the compounds in scavenging the ABTS^{•+} radical cation (SÁNCHEZ-GONZALES et al., 2005). This free radical is reduced when reacts with electron donors (PANNALA et al., 2001), which is thermodynamically possible when the compound has a reduction potential lower than the ABTS^{•+} (AWIKA et al., 2003). Flavonoids are a class of compounds that have a low reduction potential and show efficient scavenging properties against ABTS^{•+} radical cation due to their electron-donating ability (PANNALA et al., 2001; RICE-EVANS et al., 1997). Thus, it can be hypothesized that the addition of soymilk to the mixed beverage formulations increased the proportion of flavonoids (total isoflavones) in the beverages, improving the antioxidant capacity of the soy-based beverages against ABTS^{•+} radical cation.

It is important to highlight that to properly evaluate the antioxidant activity of formulations should be used different methodologies in order to choose the most suitable, once the antioxidant compounds can have the ability of scavenging different radicals in

different systems (MARQUELE et al., 2005). According to Callou (2009), there is no universal method to measure the antioxidant capacity, since each method assesses a particular antioxidant property.

3.3 Sensory attributes

The two soy-based beverages with lemongrass, lime juice and soymilk (F1 and F2) had acceptances greater than 6.8 on hedonic 9-point scale, for all attributes (Table 3), indicating that both formulations were approved by the potential consumers. The F1 and F2 formulations of the soy-based beverage had the same acceptance relative to the attributes aroma, flavor and texture; while in relation to its appearance, the F2 soy-based beverage formulation was significantly less accepted. The formulation F2 showed lower yellow (b^*) and green ($-a^*$) color parameters (Tabela 2) than F1, making its appearance less attractive to the potential consumers. In addition, Kieling and Prudencio (Artigo 1) have reported the presence of “dark particles” in lemongrass-lime mixed beverage containing LLE – lyophilized extract, which may have influenced negatively the appearance of the formulation F2 (with LLE). Only the two formulations (F1 and F2) were submitted to sensory analysis, since the aim was to develop a new soy-based beverage with lemongrass and lime juice.

Table 3 - Acceptance of the sensory attributes¹ of the soy-based beverages.

Formulation	Appearance	Aroma	Flavor	Texture	Global
F1	7.1 ^a	7.7 ^a	7.4 ^a	7.1 ^a	7.6 ^a
F2	6.8 ^b	7.4 ^a	7.3 ^a	7.2 ^a	7.3 ^a

Different lowercase letters in the same column indicate statistical difference ($p \leq 0.05$) by Tukey's means test. ¹Hedonic 9-point scale (9-Like extremely; 1-Dislike extremely). F1: LAE + LEOE + SP + TLJ + sucrose + xanthan; F2: LLE + LEOE + SP + TLJ + sucrose + xanthan. LAE = Lemongrass aqueous extract; LLE = Lemongrass lyophilized extract; LEOE = Lemongrass essential oil emulsion; SP = soymilk powder; TLJ = Tahiti lime juice.

With the adjustment of the original formulation of mixed beverage (KIELING; PRUDENCIO, Artigo 1), mostly increasing the amounts of lemongrass derivatives, the addition of soymilk powder did not impair the acceptance, since the mixed beverage with lemongrass, lime juice and soymilk was so well accepted as the mixed beverage without soy. It is important to highlight that the soy-based beverages were well accepted inclusive by the assessors that does not have the habit of consuming soy-based beverages and are therefore not

familiar with the presence of soy in beverages. This is contrary to the expected result that would be indifference or even rejection of the soy-based beverages by this group of consumers not used to the soybean flavor.

Benassi, Benassi and Mandarino (2012) evaluated the acceptance of soymilk from 13 soy cultivars. Among the thirteen soymilk samples, served pure to the 60 assessors (without sugar or any other ingredient), one obtained acceptance of 6.0 (hedonic 9-point scale) and twelve obtained acceptance lower than 5.7, indicating indifference by the potential consumers. The acceptance of flavor of three commercial soy-based beverages with orange juice was evaluated by 30 assessors, using hedonic 9-point scale (TORREZAN et al., 2004). In this study only one soy-based beverage had good acceptance (6.3) and the other two had acceptance corresponding to rejection (4.6) and indifference (5.8).

Several scientific studies emphasize the nutritional and healthy benefits to be achieved with the regular consumption of soy-based food, attributed mostly to the contents of soy protein and isoflavones (LIMA; IDA, 2014; CALLOU, 2009; MESSINA; LANE, 2007; GÓES-FAVONI et al., 2004; ESTEVES; MONTEIRO, 2001). Despite that, soy products normally do not have a great acceptance due to their characteristic flavor and aroma (BENASSI; BENASSI; MANDARINO, 2012; SILVA et al., 2010, TORREZAN et al., 2004), which cause rejection and restrict their consumption.

The results obtained for acceptance in the present study, especially to the attributes aroma and flavor, brings out many possibilities of application of the lemongrass derivatives in other soy-based products, besides soy-based beverages. The addition of lemongrass derivatives could be able to improve the flavor and aroma of several soy-based products, such as fermented soy-based beverages, soy yogurt and soy ice-cream, making them sensorially more attractive. Thus, the consumers can effectively benefit themselves from the health properties available in these products.

4. Conclusion

The soy-based beverages show distinguished physicochemical characteristics with respect to pH, ratio and color compared to the mixed beverages without soy. However, these differences do not affect negatively the sensory quality, since the soy-based beverages with lemongrass, lime juice and soymilk present pleasant aroma and flavor and have good acceptance by the potential consumers. Considering the antioxidant capacity and the physicochemical and sensory quality attributes (appearance), it is recommended to use the

lemongrass aqueous extract in the formulation of the soy-based beverages. The new soy-based beverage developed can be considered a viable source of bioactive compounds with potential health benefits to the consumers.

Acknowledgments

This study was carried out with the financial support of the Brazilian Science and Technology Research Council (CNPq, process number 306429/2015-2) and the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES).

References

AWIKA, J.M. et al. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 23, p. 6657- 6662, 2003.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1995. 1141 p.

BEMILLER, J.N.; HUBER, K.C. Carboidratos. In: **Química de alimentos de Fennema**, 4th Edition; Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O.R., Eds.; Artmed: Porto Alegre, Brasil, 2010. p.119-121.

BENASSI, V.T.; BENASSI, M.T.; MANDARINO, J.M.G. Sensory acceptance of soymilk from 13 Embrapa Soja soybean cultivars. **VI Congresso Brasileiro de soja**, Cuiabá, MT, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores e industrializadores de alimentos. **Portaria SVS/MS N° 326**, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Complementa os padrões de identidade e qualidade das bebidas. **Instrução Normativa N° 19**, 19 jun 2013.

CALLOU, K.R.A. **Teor de isoflavonas e capacidade antioxidante de bebidas à base de soja**. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CASAGRANDE, R. et al. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 183–190, 2007.

CODEX ALIMENTARIUS. **Recommended International Code of Practice**. General Principles of Food Hygiene. CAC/RCP 1-1969. Revisions, 2003, 31p.

COSTA, A.S.G. et al. Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, p. 324-328, 2012.

ESTEVES, E.A.; MONTEIRO, J.B.R. Beneficial effects of soy isoflavones on chronic diseases. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 43-52, 2001.

GÓES-FAVONI, S.P. et al. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 582-586, 2004.

KIELING, D.D.; PRUDENCIO, S.H. Development of Concentrates for the Preparation of Lemongrass-Lime Mixed Beverage: Physicochemical, Antioxidant and Sensory Properties. (unpublished; manuscript in preparation; Artigo 1).

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food**. 2nd edition. Springer: New York, NY, 2010. 596 p.

LIMA, F.S.; IDA, E.I. Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, p. 232-239, 2014.

MARCHI, R. et al. Sensory profile and stability of a new ready-to-drink passion fruit juice beverage with different sweetener systems. **CENTRUM** Católica's Working Paper n. 2012-09-0016, p. 1-34, 2012.

MARQUELE, F.D. et al. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 455-462, 2005.

MARTINS, A.C. et al. The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: Optimising the conditions using the response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 138, p. 574-580, 2013.

MEILGAARD, M.C.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory Evaluation Techniques**. 3th edition. CRC Press: Boca Raton, FL, 1999. 387p.

MENDONÇA, D. Mercado saudável. **Giro News**, v. 30, p. 30-31, 2010.

MESSINA, M.; LANE, B. Soy protein, soybean isoflavones and coronary heart disease risk: where do we stand? **Future Lipidology**, v.2, n.1, p. 55-74, 2007.

MIRHOSSEINI, H. et al. Optimization of the contents of Arabic gum, xanthan gum and orange oil affecting turbidity, average particle size, polydispersity index and density in orange beverage emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1212-1223, 2008.

PANNALA, A.S. et al. Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, p. 1161-1168, 2001.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

SANCHES-GONZALES, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffee brewed using different procedures (Italian, Espresso and Filter). **Food Chemistry**, v. 90, p. 133-139, 2005.

SILVA, J.B. et al. Relationships among sensory analysis, isoflavone and hexanal contents of soymilk powder. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 53, n. 5, p. 1197-1204, 2010.

TORREZAN, R. et al. Avaliação do perfil sensorial de alimento com soja sabor laranja. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 199-216, 2004.

ARTIGO CIENTÍFICO 4

Avaliação do Efeito de Extrato de Capim-Limão na Estabilidade de Peito de Frango Processado, Embalado a Vácuo e Armazenado em Temperatura de Refrigeração

Dirlei Diedrich Kieling^a; Melissa Furucava Delarco^b; Sandra Helena Prudencio^{a,*}

^aDepartamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos; ^bDepartamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 86057-970, Brasil.

*Autor correspondente: sandrah@uel.br Tel./fax: +55 43 3371 4080

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi obter um extrato hidro-etanólico de folhas de capim-limão e avaliar seu efeito nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos de peito de frango processado, embalado a vácuo e armazenado em temperatura de refrigeração (4 °C) durante 60 dias. O extrato hidro-etanólico de capim-limão apresentou teor de fenólicos totais de 79,62 µg EAG.mL⁻¹ e atividade antioxidante de 81,92% de inibição da atividade (% IA) de radicais livres DPPH[•]. Amostras de peito de frango processado adicionado de extrato hidro-etanólico de capim-limão (1% v/m) e do controle (sem extrato) foram submetidas às análises de acidez, peróxidos, TBARS, atividade de água, cor, Estafilococos coagulase-positiva, *Salmonella* sp e Coliformes a 45 °C nos tempos de 1, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento. A atividade de água não variou, tanto entre as duas amostras como durante o armazenamento. A adição de extrato de capim-limão inibiu a oxidação lipídica e, conseqüentemente, a formação de ácidos graxos livres, peróxidos e TBARS no peito de frango processado durante o período de armazenamento. O produto apresentou estabilidade microbiológica durante 60 dias de armazenamento, independentemente da adição de extrato. O extrato de capim-limão contribuiu para a estabilidade físico-química do peito de frango processado durante o armazenamento refrigerado.

Palavras-chave: Oxidação lipídica; *Cymbopogon citratus*; Fenólicos; Antioxidante natural.

1. Introdução

A oxidação é um fenômeno natural que ocorre nos alimentos, sendo responsável por uma série de alterações que levam à perda do valor nutricional, alteração das características sensoriais, rejeição do produto e, eventualmente, formação de compostos tóxicos. Entre as

consequências bem conhecidas da oxidação em alimentos estão descoloração dos pigmentos, degradação de vitaminas, desenvolvimento de aroma/sabor desagradável e formação de ligações cruzadas de proteínas, as quais afetam a textura. Estas reações podem ser influenciadas por fatores como calor, luz, disponibilidade de oxigênio, presença de metais pró-oxidantes e enzimas, como as lipoxigenases (ARAÚJO, 2011; LARA et al., 2011).

A oxidação lipídica está entre as causas mais frequentes de deterioração de alimentos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). A complexidade do processamento, associada à necessidade de prolongar o período de armazenamento, torna o produto vulnerável à deterioração oxidativa, fazendo-se necessária a utilização de antioxidantes capazes de oferecer proteção contra a oxidação. Os antioxidantes alimentares são compostos que interrompem a reação em cadeia na oxidação de lipídeos mediada por radicais livres (doadores de hidrogênio), que sequestram oxigênio e que complexam íons metálicos. Dentre os antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos estão o BHA, BHT, TBHQ e o galato de propila (ARAÚJO, 2011).

No entanto, o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade. Diante disso, a busca por métodos alternativos para retardar processos oxidativos em produtos alimentícios tem motivado as pesquisas com compostos naturais, que apresentem esta propriedade funcional (LUZIA; JORGE, 2010). A indústria de carnes e derivados também tem buscado soluções naturais para minimizar a rancidez oxidativa e aumentar a vida útil de produtos cárneos, em substituição aos antioxidantes sintéticos, os quais têm demonstrado efeitos negativos para a saúde em testes com animais (LARA et al., 2011).

A rancidez oxidativa é uma das principais causas da deterioração da qualidade de carnes e produtos cárneos e envolve a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (RAHARJO; SOFOS, 1993). A carne de frango apresenta em sua composição lipídios com elevada proporção de ácidos graxos poli-insaturados (43% do total), com duas a seis insaturações, sendo muito susceptível a reações oxidativas (ARAÚJO, 2011). A carne de frango é a mais consumida no Brasil, o qual é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, sendo a produção destinada para o mercado interno e exportação (MENDES, 2014). Dentre os cortes, o peito de frango destaca-se na preferência dos consumidores por se tratar de uma fonte de proteínas com baixo teor de gordura (VIEIRA, 2014), e por sua versatilidade, podendo ser utilizado como ingrediente em diversas preparações. Visando atender à demanda atual dos consumidores por produtos alimentícios saudáveis e práticos, o peito de frango processado pronto para uso surgiu como uma boa alternativa para o preparo rápido de

sanduíches naturais e outros pratos. No entanto, devido à sua composição química (ácidos graxos altamente insaturados), ao processamento aplicado e à necessidade de conservação por certo período de tempo, torna-se imprescindível a adição de antioxidantes a este produto para prevenir a oxidação lipídica.

Algumas substâncias de origem natural possuem atividade antioxidante, como é o caso dos tocoferóis e dos extratos contendo compostos fenólicos (ARAÚJO, 2011). São conhecidas as propriedades antioxidantes de uma variedade de extratos como de sementes de limão (LUZIA; JORGE, 2009) e de uva (ADÁMEZ et al., 2012), de frutas como araçá (MEDINA et al., 2011) e caqui (MILANI et al., 2012) e de plantas como marcela (CAMPAGNOL et al., 2011), alecrim e melissa (LARA et al., 2011) e de várias outras plantas medicinais de uso popular (DALAR; KONCZAK, 2013). Dentre as plantas com propriedades antioxidantes também está o capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf), planta nativa da Índia, também cultivada em países tropicais como o Brasil. É utilizada principalmente como chá medicinal e na extração de óleo essencial para indústria de cosméticos e aromas (COSTA et al., 2005). Os extratos são ricos em compostos fenólicos (fenólicos ácidos, flavonoides e taninos) que apresentam efeito antioxidante (FIGUEIRINHA et al., 2008; MARQUES; FARAH, 2009).

Embora tenham sido desenvolvidos estudos utilizando extratos de plantas como potenciais antioxidantes naturais, aplicados a produtos cárneos como salame (CAMPAGNOL et al., 2011) e carne de porco (LARA et al., 2011), até o presente momento não foi desenvolvido nenhum trabalho com aplicação de extratos naturais em peito de frango processado. A literatura também não apresenta estudos com aplicação de extrato de capim-limão como antioxidante natural, seja em produtos cárneos ou em outros produtos alimentícios, apesar de sua atividade antioxidante já ter sido investigada.

Diante disso, o objetivo deste trabalho de pesquisa foi obter um extrato hidroetanólico de capim-limão e avaliar o efeito da adição deste extrato na estabilidade físico-química e microbiológica de peito de frango processado, embalado a vácuo e armazenado em temperatura de refrigeração (4 °C) durante 60 dias.

2. Material e Métodos

2.1 Material

O capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf) utilizado na pesquisa foi cultivado na Universidade Estadual de Londrina (Londrina, Paraná, Brasil) e colhido após 60 dias de

cultivo. Peito de frango embalado e congelado, dentro do prazo de validade, foi obtido em supermercado local. Todos os reagentes utilizados nas análises eram de grau analítico. Ácido gálico, reagente de Folin-Ciocalteu's 2 N, ABTS (2,2'-azinobis-3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e TBA (Thiobarbituric acid) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2 Preparo e Caracterização do Extrato de Capim-Limão

O extrato hidro-etanólico de capim-limão foi preparado conforme descrição de Campagnol et al. (2011) para marcela (*Achyrocline satureioides*) com algumas modificações (HUNG et al., 2009). As folhas recém-colhidas de capim-limão foram lavadas em água potável e imersas em solução clorada com concentração de 150 mg.L^{-1} , durante 15 minutos. A seguir, as folhas foram enxaguadas em água filtrada, drenadas para retirar o excesso de umidade e deixadas sobre papel toalha absorvente por 15 minutos. Foram desprezadas as extremidades e utilizadas apenas as porções medianas das folhas, as quais foram picadas e trituradas em multiprocessador doméstico. A porção triturada (5 g em b.s.) foi submetida ao processo de extração com etanol 95% na proporção de 1:10 (g:mL) e filtrada em papel de filtro Whatman N.1 sob vácuo. O resíduo sólido foi re-extraído duas vezes com etanol 95% e os sobrenadantes foram combinados. O extrato foi concentrado em rota-evaporador a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e o volume final foi completado para 50 mL com etanol 95%. O extrato hidro-etanólico obtido foi armazenado em frasco âmbar à $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento do uso.

2.2.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos totais foram quantificados pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Costa et al. (2012). A leitura da absorbância foi realizada a 765 nm e o teor de fenólicos totais foi determinado a partir de uma curva padrão de ácido gálico (4 a $120 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo o resultado expresso em μg equivalentes de ácido gálico por mL de extrato ($\mu\text{g EAG.mL}^{-1}$).

2.2.2 Determinação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante em relação a radicais DPPH[•] foi determinada segundo Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com algumas modificações (CASAGRANDE et al., 2007). Foi preparado um controle contendo todas as soluções reagentes, exceto a amostra. A

leitura da absorbância foi realizada a 517 nm e a atividade antioxidante foi expressa em percentual de inibição da atividade (% IA) do radical DPPH[•] de acordo com a equação 1.

$$\% \text{ IA} = [1 - (\text{Absorbância da amostra} / \text{Absorbância do controle})] \times 100 \quad (1)$$

2.3 Processamento do Peito de Frango

O processamento do peito de frango foi realizado seguindo os princípios de boas práticas de fabricação (BRASIL, 1997) e de higiene alimentar (CODEX ALIMENTARIUS, 2003), visando obter um produto semelhante ao peito de frango processado (cozido, desfiado e embalado a vácuo) pronto para uso comercial.

O peito de frango foi cozido inteiro por imersão em água pré-aquecida até temperatura interna de 75 °C. Em seguida, foi retirado e drenado em papel toalha, cortado em pedaços e fragmentado em multiprocessador doméstico, aplicando 4 ciclos de 10 segundos. Foi adicionado 1% (v/m) do extrato hidro-etanólico de capim-limão e homogeneizado em multiprocessador por 30 segundos. Porções de 100 g foram pesadas em embalagens de polipropileno, embaladas a vácuo e armazenadas em refrigeração (4 °C) durante 60 dias. Um controle foi preparado seguindo o mesmo procedimento, porém sem adição de extrato de capim-limão.

2.4 Análises Físico-Químicas no Produto

Amostras de peito de frango processado adicionado de extrato hidro-etanólico de capim-limão e do controle foram analisadas com 1, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento com relação à acidez, índice de peróxidos, TBARS, atividade de água e cor.

2.4.1 Determinação da Acidez e do Índice de Peróxidos

Inicialmente, foi obtido um extrato clorofórmico, de acordo com o método proposto pela Instrução Normativa N^o 20 (BRASIL, 1999). Foram pesados 50 g de amostra, adicionados 150 mL de clorofórmio e mantidos em agitação durante 30 minutos. Em seguida foi filtrado em papel de filtro comum e refiltrado em papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro. O filtrado resultante foi utilizado para análise de acidez e determinação do índice de peróxidos.

Para determinação da acidez foram misturados 25 mL do filtrado com 25 mL de álcool etílico 95% neutralizado e titulado com NaOH 0,1 M em presença de indicador fenolftaleína. A acidez foi expressa em gramas de ácido oléico por 100 g de amostra (BRASIL, 1999).

Para determinação dos peróxidos resultantes da oxidação lipídica foram misturados 25 mL do filtrado com 37 mL de ácido acético e 1 mL de solução saturada de iodeto de potássio. Esta mistura foi deixada ao abrigo da luz, por 1 minuto. Após, foram adicionados 30 mL de água destilada e foi titulado com tiosulfato de sódio 0,01 M usando solução de amido a 1% (m/v) como indicador. O índice de peróxidos foi expresso em meq por kg de amostra (BRASIL, 1999).

2.4.2 Determinação de TBARS

O teste foi conduzido de acordo com o método descrito por Allen e Hamilton (1994), baseado na destilação a vapor da amostra e reação do destilado com solução de TBA. O valor de TBARS foi determinado em mg de malonaldeído por kg de amostra, multiplicando o valor da absorbância do cromógeno a 538 nm, descontado o valor do branco, pelo fator 7,8. A partir dos valores de TBARS foi calculado o percentual de inibição da oxidação (% I), para cada tempo de armazenamento, de acordo com a equação 2.

$$\% I = [(TBARS_C - TBARS_E) / TBARS_C] \times 100 \quad (2)$$

Onde:

C = amostra controle sem extrato de capim-limão

E = amostra com extrato de capim-limão

2.4.3 Cor

A cor das amostras foi medida utilizando colorímetro Minolta CR-300 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan), com iluminante D65 e observador a 10°. O instrumento foi previamente calibrado com uma placa branca padrão. A cor foi expressa como L* (luminosidade ou brilho), a* (componente vermelho-verde) e b* (componente amarelo-azul). A intensidade de cor (C*) e a tonalidade cromática (H°) também foram determinadas por leitura direta no aparelho.

2.4.4 Atividade de Água

A atividade de água (Aa) foi determinada a 25 °C por leitura direta das amostras em aparelho AquaLab (Water Activity Meter, 4 TEV, USA), previamente calibrado com água destilada.

2.5 Análises Microbiológicas

Foram realizadas as determinações de Coliformes a 45 °C (NMP.g⁻¹), Estafilococos coagulase-positiva (UFC.g⁻¹) e *Salmonella* sp (presença ou ausência em 25 g de amostra) de acordo com as metodologias descritas por Siqueira (1995, p.73-128). Estas análises foram escolhidas com base no padrão microbiológico estabelecido pela Resolução RDC N° 12 (BRASIL, 2001). As amostras de peito de frango processado com adição de extrato hidro-etanólico de capim-limão e do controle foram analisadas com 1, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento.

2.6 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado, com duas repetições, e as análises foram realizadas em triplicata. O esquema de tratamento foi em parcelas subdivididas, sendo o tratamento principal o processamento (com extrato hidro-etanólico de capim-limão e controle – sem extrato) e o tratamento secundário o tempo de armazenamento (dias). Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para comparação de médias a 5% de significância, utilizando o programa gratuito Sisvar versão 5.6, build 86 (SISVAR, 2016). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

3. Resultados e Discussão

O extrato hidro-etanólico de capim-limão apresentou teor de fenólicos totais de 79,62 \pm 0,40 mg.100 g⁻¹ de folhas (b.s.) e 81,92 \pm 0,07% de inibição da atividade (% IA) de radicais DPPH[•]. De acordo com Costa et al. (2012), os fenólicos totais são os principais compostos antioxidantes presentes em extratos vegetais. Os compostos fenólicos encontrados em maior proporção em extrato aquoso (infusão livre de óleo essencial) de folhas de capim-limão foram os fenólicos ácidos, e em menor proporção os flavonoides e taninos (FIGUEIRINHA et al., 2008). Dentre os fenólicos ácidos, os ácidos clorogênicos foram os compostos de maior prevalência em extrato metanólico e infusão de folhas de capim-limão (MARQUES; FARAH, 2009).

A percentagem de inibição da atividade de radicais DPPH[•] foi superior a determinada por Figueirinha et al. (2008) para infusão e extrato hidro-etanólico de capim-limão (62,3% IA e 58,7% IA, respectivamente). De acordo com Marques e Farah (2009), o teor de ácidos

clorogênicos influencia nas propriedades antioxidantes e sua concentração nas plantas pode variar em função de vários fatores como genética, clima, solo, tipo de cultivo, presença de patógenos e método de extração. Considerando que o valor de % IA de radicais DPPH[•] foi superior a 70%, pode-se afirmar que o extrato hidro-etanólico de capim-limão apresentou elevada atividade antioxidante (MELO; ANDRADE; 2010), indicando um potencial para uso como antioxidante natural.

Para avaliar o efeito antioxidante do extrato hidro-etanólico, quando aplicado a um produto alimentício, monitorou-se o avanço da oxidação lipídica (índices de acidez e peróxidos) e o percentual de inibição da oxidação (% I) em peito de frango processado (adicionado de extrato hidro-etanólico de capim-limão e controle – sem extrato), embalado a vácuo e armazenado durante 60 dias em refrigeração (Tabela 1).

O produto não apresentou variação significativa na acidez ao longo do tempo de armazenamento, tanto nas amostras contendo extrato de capim-limão quanto no controle, sem extrato. No entanto, o controle apresentou maior acidez ($p \leq 0,05$) que o produto com adição de extrato aos 60 dias de armazenamento. Com relação ao índice de peróxidos, não houve variação significativa nas amostras contendo extrato de capim-limão, ao longo do tempo de armazenamento. Os resultados obtidos indicam que a adição de extrato hidro-etanólico de capim-limão ao peito de frango processado preveniu a peroxidação lipídica, provavelmente devido à inativação dos radicais livres (R^{\bullet}) pelos compostos fenólicos presentes no extrato (MARTÍNEZ-FLORES et al., 2015; MARQUELE et al., 2005). Por outro lado, o controle apresentou aumento ($p \leq 0,05$) no índice de peróxidos aos 30 dias de armazenamento e posterior diminuição, aos 45 dias de armazenamento.

A oxidação de lipídios inicia-se pela remoção de um átomo de hidrogênio do ácido graxo insaturado, formando um radical livre (R^{\bullet}). Esta reação inicial ocorre pela ação de alguma espécie reativa formada pela ação do calor, luz, íons metálicos ou enzimas. Uma vez formado, o radical livre reage com o oxigênio para formar radical peroxil (ROO^{\bullet}). Esses radicais são altamente reativos e capazes de remover hidrogênio de outros ácidos graxos insaturados, formando hidroperóxidos e propagando, assim, a reação de oxidação. A reação terminal ocorre com a interação de dois radicais livres formando um composto não radical. Com o avanço da oxidação, ocorrem reações de decomposição dos peróxidos/hidroperóxidos, levando a uma diminuição do valor de peróxidos e à formação de diversos produtos como aldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos e ácidos (ARAÚJO, 2011; MARQUELE et al., 2005).

O malonaldeído, um dos produtos da decomposição dos peróxidos lipídicos, tem a capacidade de reagir com o ácido tiobarbitúrico formando um cromógeno, que é determinado pelo teste de TBARS (MARQUELE et al., 2005; RAHARJO; SOFOS, 1993). Dessa forma, o teste de TBARS é o método mais usual para acompanhar a evolução da oxidação lipídica em carnes e produtos cárneos (CAMPAGNOL et al., 2011; RAHARJO; SOFOS, 1993). Por outro lado, a eficiência antioxidante de um composto pode ser determinada pela sua capacidade em prevenir a formação de TBARS, que é expressa como percentual de inibição da oxidação (% I) (LARA et al., 2011). Os valores de % I, calculados a partir dos índices de TBARS das amostras com adição de extrato hidro-etanólico de capim-limão e controle (sem extrato) são apresentados na Tabela 1.

Os valores de % I encontrados indicam que a adição de extrato de capim-limão inibiu a oxidação lipídica no produto ao longo dos 60 dias de armazenamento refrigerado (4 °C). Porém, o efeito de inibição foi mais intenso nos primeiros 15 dias (aproximadamente 32%) e depois sua eficiência diminuiu, chegando a 15% aos 60 dias. Percebe-se, então, que a proporção do antioxidante natural incorporada ao produto, na forma de extrato hidro-etanólico de capim-limão, foi insuficiente para prevenir eficazmente a oxidação lipídica. A atividade antioxidante do extrato de capim-limão está relacionada com o teor de compostos fenólicos, os quais são capazes de interromper a reação em cadeia da oxidação lipídica por meio do sequestro de radicais livres (MARQUELE et al., 2005). No entanto, os processos envolvidos no preparo do peito de frango processado, como cozimento, corte, fragmentação e mistura podem ter acentuado a degradação dos ácidos graxos poli-insaturados (RAHARJO; SOFOS, 1993).

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos de peito de frango logo após o processamento e ao longo do armazenamento refrigerado.

Parâmetros	Tratamento	1 dia	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Acidez (g ácido oleico.100g ⁻¹)	Capim-limão	0,033 ± 0,000 ^{Aa}	0,067 ± 0,027 ^{Aa}	0,083 ± 0,019 ^{Aa}	0,092 ± 0,032 ^{Aa}	0,058 ± 0,017 ^{Ba}
	Controle	0,033 ± 0,000 ^{Aa}	0,041 ± 0,017 ^{Ba}	0,075 ± 0,016 ^{Aa}	0,083 ± 0,019 ^{Aa}	0,083 ± 0,019 ^{Aa}
Peróxidos (meq.kg ⁻¹)	Capim-limão	0,727 ± 0,343 ^{Aa}	0,424 ± 0,070 ^{Aa}	0,697 ± 0,061 ^{Ba}	0,546 ± 0,157 ^{Aa}	0,788 ± 0,252 ^{Aa}
	Controle	1,091 ± 0,000 ^{Aab}	0,818 ± 0,116 ^{Aab}	1,576 ± 0,321 ^{Aa}	0,636 ± 0,061 ^{Ab}	0,636 ± 0,061 ^{Ab}
% I	Capim-limão	32,00 ± 0,4 ^a	31,99 ± 1,05 ^a	22,30 ± 0,57 ^c	27,08 ± 0,28 ^b	15,14 ± 1,30 ^d
Aa	Capim-limão	0,989 ± 0,001 ^{Aa}	0,991 ± 0,001 ^{Aa}	0,989 ± 0,001 ^{Aa}	0,989 ± 0,001 ^{Aa}	0,989 ± 0,001 ^{Aa}
	Controle	0,990 ± 0,002 ^{Aa}	0,991 ± 0,001 ^{Aa}	0,990 ± 0,001 ^{Aa}	0,989 ± 0,001 ^{Aa}	0,991 ± 0,002 ^{Aa}
L*	Capim-limão	76,69 ± 1,12 ^{Ac}	78,56 ± 1,09 ^{Abc}	85,68 ± 1,31 ^{Aa}	77,93 ± 1,79 ^{Abc}	79,41 ± 0,82 ^{Ab}
	Controle	76,78 ± 1,30 ^{Ac}	79,15 ± 1,28 ^{Ab}	83,89 ± 0,73 ^{Ba}	77,99 ± 1,89 ^{Abc}	78,94 ± 1,26 ^{Ab}
a*	Capim-limão	2,01 ± 0,04 ^{Aa}	1,56 ± 0,51 ^{Aa}	2,18 ± 0,51 ^{Aa}	0,80 ± 0,23 ^{Aa}	0,63 ± 0,19 ^{Aa}
	Controle	1,21 ± 0,12 ^{Aab}	1,30 ± 0,41 ^{Aab}	2,07 ± 0,14 ^{Aa}	0,05 ± 0,07 ^{Ab}	0,20 ± 0,07 ^{Ab}
b*	Capim-limão	14,26 ± 0,69 ^{Ab}	13,98 ± 0,26 ^{Bc}	13,08 ± 1,15 ^{Ad}	14,71 ± 0,15 ^{Aa}	14,79 ± 0,87 ^{Ba}
	Controle	14,36 ± 0,25 ^{Ac}	14,53 ± 0,39 ^{Abc}	13,12 ± 1,10 ^{Ad}	14,65 ± 1,31 ^{Ab}	15,68 ± 0,30 ^{Aa}
C*	Capim-limão	14,40 ± 0,68 ^{Ab}	14,08 ± 0,30 ^{Bc}	13,27 ± 1,06 ^{Ad}	14,73 ± 0,16 ^{Aa}	14,81 ± 0,86 ^{Ba}
	Controle	14,41 ± 0,25 ^{Ac}	14,59 ± 0,36 ^{Abc}	13,28 ± 1,11 ^{Ad}	14,65 ± 1,31 ^{Ab}	15,68 ± 0,31 ^{Aa}
H°	Capim-limão	81,96 ± 0,53 ^{Aab}	83,65 ± 1,98 ^{Aab}	80,36 ± 2,97 ^{Ab}	86,88 ± 0,86 ^{Aab}	87,52 ± 0,88 ^{Aa}
	Controle	85,16 ± 0,48 ^{Aab}	84,85 ± 1,72 ^{Aab}	81,03 ± 0,19 ^{Ab}	89,79 ± 0,29 ^{Aa}	89,27 ± 0,25 ^{Aa}

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$) ao longo do tempo; letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos (teste de médias de Tukey) em cada parâmetro avaliado. Controle: Sem extrato de capim-limão; Capim-limão: Adição de 1% (v/m) de extrato hidro-etanólico de folhas de capim-limão.

Campagnol et al. (2011) avaliaram o efeito antioxidante em dois níveis (0,5% e 1%) de extrato hidro-etanólico de marcela em salames. Os pesquisadores verificaram que o tratamento com 1% de extrato de marcela foi mais efetivo na diminuição dos valores de TBARS ($p \leq 0,05$), prevenindo a oxidação lipídica em salames maturados em torno de 40% durante 60 dias de armazenamento a 25 °C, em embalagem a vácuo.

Lara et al. (2011) estudaram o efeito antioxidante de extratos naturais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e de melissa (*Melissa officinalis* L.), comparado ao antioxidante sintético BHT, adicionados a hambúrgueres de carne suína, assados, acondicionados em embalagem tipo filme laminado com atmosfera modificada (70% N₂ + 30% CO₂) e mantidos a 4 ± 1 °C por 6 dias. Os autores observaram 90,7% de inibição da oxidação no produto com extrato de alecrim, 74,8% com extrato de melissa e de 76,3% com BHT durante o armazenamento refrigerado. Neste caso, além da origem do extrato (composição), o curto período de armazenamento e a embalagem com proteção à luz e atmosfera modificada possivelmente contribuíram para uma inibição da oxidação (% I) mais efetiva.

Observa-se, então, que a proporção ou a concentração do extrato de capim-limão adicionado ao peito de frango processado poderia ser aumentada ou, ainda, poderiam ser utilizadas medidas auxiliares (embalagem com proteção à luz, atmosfera modificada) para obter-se um maior efeito de inibição da oxidação lipídica (% I). No entanto, é importante ressaltar a necessidade de ser conduzida uma avaliação sensorial do peito de frango processado, visando determinar qual a quantidade máxima de extrato de capim-limão que poderia ser adicionada sem comprometer a aceitação do produto pelos consumidores.

Quanto à atividade de água (Aa), não houve diferença significativa entre as amostras com extrato de capim-limão e o controle, em nenhum dos tempos de armazenamento estudados (Tabela 1), indicando que a adição do extrato de capim-limão não interferiu na Aa do peito de frango processado. Observou-se, ainda, que tanto as amostras com extrato quanto o controle não apresentaram variação na Aa ao longo do tempo, evidenciando que a embalagem preveniu a perda de água do produto durante o armazenamento. O mesmo efeito protetivo da embalagem foi verificado por Menegas et al. (2013) para linguiça de frango maturada e embalada a vácuo, a qual não apresentou variação na Aa durante 45 dias de armazenamento a 4 °C. Segundo os autores, a embalagem não permitiu perda de água durante o armazenamento, prevenindo problemas sensoriais relacionados à aparência do produto.

Os parâmetros de cor (L*, a*, b*, C* e H°) do peito de frango processado também foram avaliados ao longo do tempo de armazenamento (Tabela 1).

A adição de extrato de capim-limão não afetou a cor do peito de frango processado, uma vez que no primeiro dia de armazenamento não foi verificada diferença significativa entre as amostras com extrato e o controle, em nenhum dos parâmetros (L^* , a^* , b^* , C^* e H°). Ambas as amostras apresentaram uma elevação nos valores de L^* ao longo do tempo, atingindo o valor máximo aos 30 dias de armazenamento; neste mesmo período (30 dias), foi observada uma diminuição na intensidade da cor (C^*) amarela (b^*), indicando que as amostras tornaram-se mais claras.

A amostra com extrato de capim-limão não apresentou variação significativa na cor vermelha (a^*) ao longo do tempo, enquanto o controle apresentou uma ligeira descoloração (diminuição de a^*) após 30 dias de armazenamento. No final do período de armazenamento (60 dias), o controle apresentou valores mais elevados do parâmetro b^* (amarelo) e maior intensidade de cor do que a amostra contendo extrato de capim-limão, ou seja, o controle apresentou-se mais amarelado. As amostras apresentaram tonalidade cromática (H°) entre vermelho e amarelo, porém mais próximo do amarelo (90°).

A cor da carne depende da concentração e do estado químico da mioglobina. As diferenças observadas entre os tratamentos (com extrato e controle) para os valores de a^* e b^* no final do período de armazenamento, sugerem uma menor proporção de pigmento oxidado (oximioglobina) na amostra contendo extrato, possivelmente atribuído ao efeito antioxidante e protetivo dos compostos fenólicos presentes no extrato, o que favorece a preservação da cor (Lara et al., 2011; Campagnol et al., 2011).

Não foi detectada a presença de Estafilococos coagulase-positiva, *Salmonella* sp e Coliformes a 45°C ao longo do período de armazenamento de 60 dias, tanto nas amostras contendo extrato de capim-limão quanto no controle. Faz-se exceção a uma das amostras com extrato de capim-limão, correspondente ao tempo de 15 dias de armazenamento, a qual apresentou contagem de 11 NMP.g^{-1} de Coliformes a 45°C , ainda assim abaixo do limite estabelecido pela legislação (BRASIL, 2001) que é de 105 NMP.g^{-1} . No entanto, a presença de Coliformes a 45°C não foi confirmada nos tempos de armazenamento posteriores, indicando uma contaminação pontual de uma das amostras do tempo de 15 dias, possivelmente associada à embalagem na qual a amostra foi acondicionada.

Os resultados obtidos evidenciam que a embalagem a vácuo e o armazenamento refrigerado (4°C), associados ao cozimento inicial do peito de frango e às boas práticas empregadas no processamento, asseguraram a qualidade e estabilidade microbiológica do produto com relação aos grupos de microrganismos estudados.

4. Conclusão

A adição de 1% de extrato hidro-etanólico de capim-limão inibe a oxidação lipídica e contribui para a estabilidade do peito de frango processado durante o armazenamento refrigerado, sem afetar negativamente as características físico-químicas do produto. O peito de frango processado apresenta estabilidade microbiológica frente a *Estafilococos* coagulase-positiva, *Salmonella* sp e Coliformes a 45 °C durante 60 dias de armazenamento refrigerado, independentemente da adição de extrato de capim-limão.

Agradecimentos

À CAPES, pela bolsa de Doutorado de D.D. Kieling e à Fundação Araucária pela bolsa de Iniciação Científica de M.F. Delarco.

Referências

- ADÁMEZ, J.D. et al. In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). **Food Control**, v. 24, p. 136-141, 2012.
- ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. **Rancidity in foods**. 3rd ed. Chapman & Hall, London, UK, 1994. p.31-32.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: Teoria e prática**. 5^a ed., Viçosa, MG: Ed. UFV, 2011. p. 9-133.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v.28, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Resolução RDC Nº 12**, de 2 de janeiro de 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes. **Instrução Normativa N.20**, de 9 de setembro de 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. **Portaria SVS/MS N. 326**, 1997.
- CAMPAGNOL, P.C.B. et al. The influence of *achyrocline satureioides* (“Marcela”) extract on the lipid oxidation of salami. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 1, p. 101-105, 2011.
- CASAGRANDE, R. et al. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 183–190, 2007.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Recommended International Code of Practice: General Principles of Food Hygiene**. CAC/RCP 1-1969, Revisions, 2003. 31p.

- COSTA, A.S.G. et al. Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, p. 324-328, 2012.
- COSTA, L.C.B. et al. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 956-959, 2005.
- DALAR, A.; KONCZAK, I. Phenolic contents, antioxidant capacities and inhibitory activities against key metabolic syndrome relevant enzymes of herbal teas from Eastern Anatolia. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 383– 390, 2013.
- FIGUEIRINHA, A. et al. *Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. **Food Chemistry**, v. 10, p. 718–728, 2008.
- HUNG, P.V. et al. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. **Food Research International**, v.42, p. 185-190, 2009.
- LARA, M.S. et al. Evaluation of two natural extracts (*Rosmarinus officinalis* L. and *Melissa officinalis* L.) as antioxidants in cooked pork patties packed in MAP. **Meat Science**, n.88, p. 481– 488, 2011.
- LUZIA, D.M.M.; JORGE, N. Atividade Antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 946-949, 2009.
- MARQUELE, F.D. et al. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 455–462, 2005.
- MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370–1376, 2009.
- MARTÍNEZ-FLORES, H.E. et al. Physico-chemical parameters, bioactive compounds and microbial quality of thermo-sonicated carrot juice during storage. **Food Chemistry**, v. 172, p. 650–656, 2015.
- MEDINA, A.L. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, p. 916–922, 2011.
- MELO, E.A.; ANDRADE, R.A.M.S. Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos do umbuzeiro. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 453-457, 2010.
- MENDES, A.A. Regulamentação: O governo e a regulamentação da produção – barreiras ou oportunidades. Embrapa Suínos e Aves. In: **XV Simpósio Brasil Sul de Avicultura** (Anais). Chapecó, SC, 08 a 10 de abril de 2014. p.16-23.
- MENEGAS, L.Z. et al. Dry-fermented chicken sausage produced with inulin and corn oil: Physicochemical, microbiological, and textural characteristics and acceptability during storage. **Meat Science**, v. 93, p. 501 – 506, 2013.
- MILANI, L.I.G. et al. In vitro antioxidant and antimicrobial properties of persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Rama Forte) extracts. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 118-124, 2012.
- RAHARJO, S.; SOFOS, J. N. Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: A review. **Meat Science**, n.35, p. 145-169, 1993.

SILVA, F.A.M.; BORGES, F.M.; FERREIRA, M.A. Methods for the evaluation of the degree of lipid oxidation and the antioxidant activity. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: Embrapa, 1995. 159 p.

SISVAR. 2016. Sistema de análise estatística e planejamento de experimentos. Versão 5.6, build 86. Obtido em 10 de abril de 2016 em:

<http://www.dex.ufla.br/~danielff/programas/sisvar.html>

VIEIRA, S.L. Considerações sobre as características de qualidade de carne de frango e fatores que podem afetá-la. Embrapa Suínos e Aves. *In: XV Simpósio Brasil Sul de Avicultura* (Anais). Chapecó, SC, p. 59-72, 08 a 10 de abril de 2014.

CONCLUSÕES

- Os concentrados líquidos elaborados para o preparo de bebidas mistas de capim-limão e lima ácida caracterizam-se como produto ácido, de cor amarela, contendo compostos bioativos (vitamina C e fenólicos) que conferem ao produto importantes propriedades antioxidantes.
- Na formulação dos concentrados devem ser utilizados, preferencialmente, extrato aquoso de capim-limão ou extrato liofilizado e óleo essencial, uma vez que estes concentrados originam bebidas mistas com maior intensidade de aroma e sabor capim-limão, as quais são mais apreciadas.
- É possível elaborar concentrados com derivados de capim-limão e suco de lima ácida para a preparação de bebidas mistas que são, ao mesmo tempo, aceitas sensorialmente e potencialmente benéficas à saúde dos consumidores.
- O processamento por alta pressão hidrostática (APH) a pressões de até 250 MPa e 25 °C de temperatura por um curto período de tempo (1-2 min) não afeta o teor de vitamina C e fenólicos totais da bebida mista de capim-limão e lima ácida.
- O tratamento não térmico da bebida mista por APH a 250 MPa e 25 °C por 1 min é capaz de garantir segurança microbiológica e aumentar a qualidade microbiológica e o tempo de vida útil da bebida mista não tratada, resultando em melhor retenção dos compostos bioativos e das características físico-químicas originais da bebida mista do que a pasteurização térmica.
- As bebidas mistas de capim-limão e lima ácida com soja apresentam características físico-químicas distintas com relação ao pH, ratio e cor, comparadas às bebidas mistas sem soja. Porém, estas diferenças não afetam negativamente a qualidade sensorial, uma vez que as bebidas mistas com soja apresentam aroma e sabor agradáveis e são bem aceitas pelos consumidores em potencial.
- Considerando a capacidade antioxidante e os atributos de qualidade físico-química e sensorial (aparência), é recomendado utilizar extrato aquoso de capim-limão na formulação das bebidas mistas com soja.
- A nova bebida à base de soja desenvolvida pode ser considerada uma fonte viável de compostos bioativos com potenciais benefícios para a saúde.
- A adição de 1% de extrato hidro-etanólico de capim-limão inibe a oxidação lipídica e contribui para a estabilidade do peito de frango processado durante o armazenamento

refrigerado, sem afetar negativamente as características físico-químicas do produto, indicando um potencial para uso como antioxidante natural.

ANEXO
TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

21/7/2014

XXIV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos & IV Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais

25 a 29 de setembro de 2014 - Aracaju/SE - Centro de Convenções de Sergipe - Brasil

[APRESENTAÇÃO](#)
[COMISSÕES](#)
[PALESTRANTES](#)
[PROGRAMA](#)
[MINI-CURSOS](#)
[INSCRIÇÃO](#)
[ENVIO DE RESUMOS](#)
[LOCAL / COMO CHEGAR](#)
[HOSPEDAGEM / AGÊNCIA](#)
[CONHEÇA SERGIPE](#)
[EXPOSITORES](#)
[APOIO / PATROCINADORES](#)
[FALE CONOSCO](#)
[ACESSO DO USUÁRIO](#)



**XXIV CONGRESSO
BRASILEIRO**
DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS





IV CONGRESSO DO INSTITUTO NACIONAL DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE FRUTOS TROPICAIS

ACESSO DO USUÁRIO

Bem-vindo, DIRLEI

Acompanhe abaixo a avaliação de seu(s) Resumo(s):

<p>Área do Trabalho: 6 - Antioxidantes e Compostos Ativos</p> <p>1º Resumo : dirlei_kieling_yahoo_com_br_POSTER_6_Kieling, Dirlei Diedrich_Avaliação do Teor de Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante de Derivados de Capim-limão - Extrato Aquoso, Extrato Liofilizado e Óleo Essencial.doc</p> <p>Status : Resumo Aceito.</p>
<p>Área do Trabalho: 3 - Análise Sensorial de Alimentos</p> <p>2º Resumo : dirlei_kieling_yahoo_com_br_POSTER_3_Kieling, Dirlei Diedrich_Elaboração de Concentrados de Capim-limão com Polpa de Limão e Açúcar e Avaliação Sensorial dos Sucos Preparados a partir dos Concentrados.doc</p> <p>Status : Resumo Aceito.</p>

Avaliação do Teor de Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante de Derivados de Capim-limão: Extrato Aquoso, Extrato Liofilizado e Óleo Essencial.

Dirlei Diedrich Kieling¹, José Roberto Pinto de Souza² e Sandra Helena Prudencio¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos/CCA/DCTA

²Programa de Pós-Graduação em Agronomia/CCA/AGRO

Universidade Estadual de Londrina

86057-970 – Londrina – PR, Brasil

dirlei_kieling@yahoo.com.br

Palavras-chave: *Cymbopogon citratus*, Compostos bioativos, Antioxidantes naturais.

Resumo

O capim-limão (*Cymbopogon citratus* stapf) é uma planta aromática, originária da Índia, cultivada no Brasil principalmente para preparo de chá e extração do óleo essencial, também denominado populamente capim-santo, capim-de-cheiro ou capim-cidreira. Pesquisadores identificaram a presença de compostos fenólicos, como ácidos clorogênicos, taninos e flavonoides em extrato metanólico e infusões de capim-limão, substâncias com conhecida atividade antioxidante. Assim, o objetivo do trabalho foi obter e analisar comparativamente extrato aquoso, liofilizado e óleo essencial de capim-limão quanto ao teor de fenólicos totais e atividade antioxidante. O capim-limão foi cultivado em vasos em condições ambientais e o corte das folhas realizado aos 77 dias de cultivo. O extrato aquoso (EA) foi obtido a partir da trituração de 50 g de folhas frescas com 200 mL de água destilada, seguido de filtração em tecido tipo voal. Uma porção de EA foi congelada a -18°C e submetida à desidratação em liofilizador, obtendo-se o extrato liofilizado (EL). O óleo essencial (OE) foi extraído em mini destilador por arraste a vapor. Nos derivados de capim-limão assim obtidos foi determinado o teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, em µg Equivalente em Ácido Gálico (EAG) por mL, e atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS, expressos como %IA (Inibição da Atividade do radical livre). Foram encontradas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) no teor de fenólicos totais e atividade antioxidante entre os derivados. OE apresentou maior teor de fenólicos totais que EA e EL (225,07; 72,72 e 58,21 µgEAG.mL⁻¹, respectivamente) e maior atividade antioxidante pelo método DPPH (65,37; 42,39 e 36,36 %IA, respectivamente). No entanto, pelo método ABTS a atividade antioxidante foi EA>EL>OE (23,42; 20,74 e 15,96 %IA, respectivamente). O efeito antioxidante frente ao radical livre DPPH• foi maior do que com relação ao radical livre ABTS•⁺, para todos os derivados de capim-limão.

Elaboração de Concentrados de Capim-limão com Polpa de Limão e Avaliação Sensorial dos Sucos Preparados a partir dos Concentrados.

Dirlei Diedrich Kieling¹, Melissa Delarco² e Sandra Helena Prudencio¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos/CCA/DCTA

²Curso de Graduação em Farmácia/CCS/DCF

Universidade Estadual de Londrina

86057-970 – Londrina – PR, Brasil

dirlei_kieling@yahoo.com.br

Palavras-chave: *Cymbopogon citratus*, Suco concentrado, Aceitação.

Resumo

No Brasil, capim-limão (*Cymbopogon citratus*) é utilizado principalmente para chá, extração do óleo essencial e, em algumas regiões, para preparo caseiro de sucos com polpa de frutas, destacando-se aroma/sabor agradável e refrescante. Não existem pesquisas com sucos contendo capim-limão, assim, objetivou-se desenvolver concentrados contendo extrato aquoso (EA), liofilizado (EL) e óleo essencial (OE) de capim-limão, polpa de limão e açúcar e verificar a aceitação dos respectivos sucos. EA foi obtido por trituração das folhas frescas com água filtrada e filtração em tecido voal. Uma porção de EA foi liofilizada, obtendo-se EL. OE foi extraído por hidrodestilação e utilizado no preparo de emulsão (EOE). Polpa de limão Tahiti foi obtida em espremedor mecânico e filtrada em voal. Foram formulados três concentrados com polpa de limão (100 g) e diferentes quantidades de açúcar (60, 90 e 120 g), congelados e mantidos a -18°C em freezer doméstico. Cada concentrado foi homogeneizado com igual volume de EA (definido em testes preliminares) e água filtrada, obtendo-se três sucos que foram submetidos a Teste de Ordenação da Preferência com 60 julgadores. A partir da formulação preferida (90 g de açúcar), foram elaborados três concentrados de capim-limão, polpa de limão e açúcar, variando-se o derivado de capim-limão (F1=EA, F2=EL e F3=EL+EOE), congelados e mantidos a -18°C. Estes foram utilizados no preparo de sucos e, então, submetidos a Testes de Aceitação de Atributos (escala hedônica de 9 pontos) e Intenção de Compra (escala de 5 pontos) com 100 consumidores. A aceitação da aparência e textura das formulações situou-se entre 7 (gostei moderadamente) e 8 (gostei muito), sendo a F1 a mais apreciada ($p \leq 0,05$). F1 e F3 apresentaram aroma, sabor e aceitação global entre 7 e 8, superior ($p \leq 0,05$) a F2 (notas de 6, gostei ligeiramente, a 7, gostei moderadamente). Os consumidores provavelmente comprariam (nota 4) F1 e F3.



EFEITO DO EXTRATO DE CAPIM-LIMÃO NA ESTABILIDADE DE PEITO DE FRANGO PROCESSADO, EMBALADO A VÁCUO E ARMAZENADO SOB REFRIGERAÇÃO

Melissa Furucava Delarco (Bolsista Fundação Araucária), Dirlei Diedrich Kieling, Sandra Helena Prudencio, email: sandrah@uel.br

Universidade Estadual de Londrina / Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/CCA

Área e sub-área do conhecimento: 5.07.00.00-6 / 5.07.01.00-2.

Palavras-chave: *Cymbopogon citratus*; Fenólicos; Oxidação.

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito do extrato etanólico de folhas de capim-limão nas características físico-químicas de peito de frango processado, embalado a vácuo e armazenado em refrigeração (4 °C) durante 60 dias. O extrato de capim-limão apresentou 79,62 µg EAG.mL⁻¹ de fenólicos totais e atividade antioxidante de 81,92% (método DPPH) e 22,62% (método ABTS). Prepararam-se duas amostras de frango processado, uma com extrato (1 mL.100g⁻¹) e um controle sem o extrato. A adição de extrato inibiu a oxidação (TBARS) e a formação de peróxidos no peito de frango processado durante os 60 dias de armazenamento. A acidez e atividade de água não variaram entre as duas amostras, e durante o armazenamento. O extrato de capim-limão contribuiu para a estabilidade físico-química do peito de frango processado durante o armazenamento.

Introdução e objetivo

A oxidação é um fenômeno natural que ocorre em alimentos e bebidas, sendo responsável por alterações nas características químicas, físicas e sensoriais, eventualmente, formação de compostos tóxicos e até a rejeição do produto. A complexidade do processamento, associada à necessidade de aumentar o tempo de armazenamento, torna o alimento vulnerável à deterioração oxidativa. Portanto, a utilização de substâncias antioxidantes, capazes de proteger o alimento contra a oxidação, faz-se necessária (ARAÚJO, 2011). Os antioxidantes mais comuns são as substâncias fenólicas, sendo sintéticos ou naturais, como os tocoferóis e extratos vegetais polifenólicos (LINDSAY, 2010). O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da adição de extrato etanólico de folhas de capim-limão na estabilidade físico-química de peito de frango processado, embalado a vácuo e armazenado em refrigeração (4 °C) durante 60 dias.

Procedimentos metodológicos

Preparo e caracterização do extrato de capim-limão

O extrato etanólico de folhas frescas de capim-limão foi preparado conforme descrito por Campagnol et al. (2011) e HUNG et al. (2009). No extrato obtido foram quantificados os compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu (SWAIN E HILLIS, 1959) e avaliada a atividade antioxidante pelos métodos da capacidade de sequestrar radicais livres DPPH[•] (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995), e radicais livres ABTS^{•+} (SANCHES-GONZALES; JIMÉNEZ-ESCRIG; SAURA-CALIXTO, 2005).

Processamento do peito de frango

O peito de frango cozido por imersão, em água pré-aquecida, até temperatura interna de 75 °C, foi drenado e seco em papel toalha; cortado e processado em multiprocessador doméstico. Porções de 70 g de frango sem (controle - C) e com adição (1 mL.100g⁻¹) do extrato de capim-limão (E) foram embaladas à vácuo, armazenadas em refrigeração (4 °C) e analisadas com 1, 15, 30, 45 e 60 dias. Os procedimentos de preparo do peito de frango seguiram os princípios de boas práticas de fabricação (BRASIL, 1997) e de higiene alimentar (CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

Análises físico-químicas das amostras

A acidez (gramas de ácido oleico por 100 g de amostra) e o índice de peróxidos (mEq por 1kg de amostra) (IAL, 2008) foram medidos em extratos clorofórmicos das amostras de frango, obtido conforme a Instrução Normativa n° 20 (BRASIL, 1999).

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) resultantes da oxidação lipídica foram determinadas conforme Kirk e Sawyer (1991). A eficiência antioxidante do extrato de capim limão foi calculada, em cada tempo de armazenamento, como percentual de inibição da oxidação (% I).

$$\% I = [(TBARS_C - TBARS_E)/TBARS_C] \times 100$$
, onde: C = amostra controle; E = amostra com extrato de capim-limão.

A atividade de água foi determinada a 25 °C por leitura direta em aparelho AquaLab, previamente calibrado com água destilada.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com duas repetições, e as análises em triplicata. Os dados foram tratados por ANOVA e teste de Tukey (p < 0,05) no programa *Statistica 7.0* (STATSOFT, 2006).

Resultados e discussão

O extrato de capim-limão apresentou teor de fenólicos totais de 79,62 µg EAG.mL⁻¹ e atividade antioxidante de 22,62% (método ABTS) e de 81,92% (método DPPH), sendo considerada elevada, uma vez que foi superior a 70% (método DPPH) (MELO; ANDRADE, 2010).

Os resultados das análises físico-químicas do peito de frango durante o armazenamento refrigerado estão na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos do peito de frango durante o armazenamento.

Análise	Amostra	1 dia	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Acidez (g ácido oleico.100 g ⁻¹)	E	0,033 ^{aA}	0,067 ^{aA}	0,083 ^{aA}	0,092 ^{aA}	0,058 ^{aB}
	C	0,033 ^{aA}	0,041 ^{aB}	0,075 ^{aA}	0,083 ^{aA}	0,083 ^{aA}
Peróxidos (meq.kg ⁻¹)	E	0,727 ^{aA}	0,424 ^{aA}	0,697 ^{aB}	0,546 ^{aA}	0,788 ^{aA}
	C	1,091 ^{abA}	0,818 ^{abA}	1,576 ^{aA}	0,636 ^{bA}	0,636 ^{bA}
% I	-	32,00 ^a	31,99 ^a	22,30 ^c	27,08 ^b	15,14 ^d
Aa	E	0,99 ^{aA}	0,99 ^{aA}	0,99 ^{aA}	0,99 ^{aA}	0,99 ^{aA}
	C	0,99 ^{aA}	0,99 ^{aA}	0,99 ^{aA}	0,99 ^{aA}	0,99 ^{aA}

Médias com mesma letra (minúscula) na mesma linha e com mesma letra (maiúscula) na mesma coluna, para cada análise, não diferem no nível de 5%. E = amostras com extrato de capim-limão; C = amostras controle. % I = percentual de inibição da oxidação por TBARS. Aa = atividade de água. **Fonte:** o próprio autor.

A acidez não variou significativamente ao longo do armazenamento de 60 dias, tanto nas amostras contendo extrato de capim-limão (E), quanto no controle (C). No entanto, o controle apresentou maior acidez ($p \leq 0,05$) que o produto com adição de extrato no final do armazenamento.

Quanto ao índice de peróxidos, não houve variação nas amostras contendo extrato de capim-limão, ao longo do armazenamento. No entanto, o controle apresentou um aumento no valor de peróxidos aos 30 dias de armazenamento. O resultado indica que a adição de extrato de capim-limão ao peito de frango processado preveniu a formação de peróxidos. O percentual de inibição da oxidação (% I), avaliado pelo TBARS, mostrou que a adição de extrato de capim-limão inibiu a oxidação lipídica no produto ao longo dos 60 dias de armazenamento refrigerado (4 °C). No entanto, o efeito de inibição foi maior (~32%) nos primeiros 15 dias e depois diminuiu, chegando a 15% aos 60 dias, indicando que a capacidade antioxidante do extrato de capim-limão obtido no presente estudo, ou a quantidade de extrato adicionada ao produto foi insuficiente para prevenir a oxidação lipídica eficazmente ao longo dos 60 dias de armazenamento.

As amostras com extrato (E) e o controle (C) não se diferenciaram quanto a Aa em todos os tempos de armazenamento, indicando que a adição do extrato de capim-limão não interferiu na Aa do peito de frango processado.

Conclusão

O extrato etanólico de folhas de capim-limão contribuiu para a estabilidade físico-química do peito de frango processado e armazenado em refrigeração.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pela bolsa de Iniciação Científica da primeira autora e a CAPES pela bolsa de Doutorado da segunda autora.

Referências

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: Teoria e prática**. 5. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2011. 601p.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**. n.28, 1995. p.25-30.

BRASIL (1997). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. *Portaria SVS/MS N. 326*.

CAMPAGNOL, P.C.B. et al. The influence of achyrocline satureioides (“Marcela”) extract on the lipid oxidation of salami. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 31(1): 101-105, 2011.

CODEX ALIMENTARIUS. (2003). Recommended International Code of Practice. *General Principles of Food Hygiene*. CAC/RCP 1-1969, Revisions, 31p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. (1. ed. digital). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p.1020.

KIRK, R.S.; SAWYER, R. (1991). Fats and Oils. In: **Pearson’s Composition and Analysis of Foods**, 9th ed. Longman Group Limite, UK. p. 641.

SANCHES-GONZALES, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffee brewed using diferente procedures (Italian, Espresso and Filter). **Food Chemistry**, v.90, 2005. p.133-139.

SWAIN, T.; HILLIS, W.T. The phenolic constituents of Prunus domestica. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, 1959. p.135-144.