

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO E LICENCIATURA EM QUÍMICA**

MIRELLI BIANCHIN

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ERVAS AROMÁTICAS E
PÓLEN APÍCOLA E SEUS EFEITOS DURANTE
ARMAZENAMENTO DE PATÊ DE FRANGO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2014

MIRELLI BIANCHIN

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ERVAS AROMÁTICAS E PÓLEN APÍCOLA E SEUS EFEITOS DURANTE ARMAZENAMENTO DE PATÊ DE FRANGO

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof^a Dr^a Solange Teresinha Carpes

FOLHA DE APROVAÇÃO

TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **Atividade antioxidante de ervas aromáticas e pólen apícola e seus efeitos durante armazenamento de patê de frango** foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N°

2.16/2013-B de 2014.

Fizeram parte da banca os professores.

Profª Drª Solange Teresinha Carpes

Mscª Leila Fernanda Serafini

Profª Drª Marina Leite Mitterer Daltoé

*Dedico aos pais, meus exemplos de vida,
minha fonte de inspiração, apoio e ensino
diário.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, força e coragem.

À minha família, em especial aos meus pais, meus exemplos de vida, minha fonte de inspiração, apoio e ensino diário, meu mais sincero agradecimento por me incentivarem a concluir mais essa etapa, e que com muita sabedoria, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis.

Ao meu namorado, Hugo Henrique Carline de Lima, pelo amor, carinho, compreensão e companheirismo.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Solange Teresinha Carpes, a qual aprendi respeitar e admirar, meu muito obrigado por mostrar o caminho da ciência, pela oportunidade fornecida, pelo companheirismo, profissionalismo, pela paciência nos momentos mais difíceis, pelo incentivo, por acreditar em minha capacidade, durante estes três anos de trabalho e fundamentalmente por ser peça essencial do meu desenvolvimento como profissional e como pessoa.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa, Jacqueline, Daiane, Amália, Cristiane, Rafaelly, pelos momentos de descontração, aprendizagem, boas conversas, em especial a Leila Fernanda Serafini e Maíra Casagrande pela realização das análises antioxidantes dos antioxidantes comerciais.

Os estagiários e responsáveis pelos laboratórios de química pelo fornecimento de materiais e reagentes.

À Prof^a Ms. Simone Beux pelo empréstimo de equipamentos.

À Prof^a Dr^a Marina Leite Mitterer Daltoé e a Ms. Leila Fernanda Serafini pelas contribuições fornecidas à este trabalho.

E por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se o não fizerem ali?”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

BIANCHIN, Mirelli. Atividade antioxidante de ervas aromáticas e pólen apícola e seus efeitos durante armazenamento de patê de frango. (76) f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco 2014

Os produtores de alimentos têm se deparado cada vez mais com o desafio de satisfazer os consumidores que exigem a adoção de uma política decrescente de uso de conservantes sintéticos. O receio ao consumo desses antioxidantes deve-se à sua toxicidade e por estar relacionado a diversas doenças. Assim, busca-se a redução destes e a substituição por antioxidantes naturais, uma vez que estes não interferem na qualidade sensorial e nutricional de produtos. Neste contexto as ervas aromáticas e o pólen apícola apresentam-se como alternativas de antioxidante por possuírem compostos bioativos que inibem direta ou indiretamente o excesso de radicais livres e a peroxidação lipídica dos alimentos. Deste modo este trabalho avaliou as propriedades bioativas do Alecrim (*Rosmarinus officinalis*), Sálvia (*Salvia officinalis*), Manjeriço (*Ocimum basilicum*) e Pólen Apícola Orgânico e suas implicações como antioxidantes naturais durante o armazenamento de patê de frango, em alternativa ao antioxidante comercial eritorbato de sódio. Os extratos das plantas e do pólen mostraram-se agentes antioxidantes promissores apresentando significativos resultados em relação aos compostos fenólicos e flavonoides. Dentre os métodos de atividade antioxidante o extrato de alecrim e de sálvia se destacaram mostrando em algumas análises resultados superiores aos antioxidantes comerciais. Em relação à oxidação lipídica, não houve a formação de peróxidos em nenhuma formulação, durante o período de armazenamento do produto. Na análise de TBARS, a qual foi realizada durante 28 dias de armazenamento, os extratos foram adicionados na mesma concentração que o antioxidante eritorbato de sódio, sendo que o extrato de alecrim e de sálvia comportaram-se similarmente ao antioxidante comercial.

Palavras-chave: Antioxidantes naturais, alecrim, sálvia, manjeriço, pólen apícola, eritorbato de sódio, substituição, patê de frango, oxidação lipídica.

ABSTRACT

BIANCHIN, Mirelli. Antioxidant activity of herbs and bee pollen and its effects during storage of chicken pate. () F. Working End of Course (Bacalaureate in Chemistry), Federal Technological University of Paraná. Pato Branco 2014.

Food producers have faced increasingly with the challenge of satisfying consumers who require the adoption of a policy of declining use of synthetic preservatives. The fear the consumption of these antioxidants is due to their toxicity and because it is related to several diseases. Thus, attempts to reduce these and substitution of natural antioxidants, as these don't interfere with the sensory and nutritional quality of products. In this context extracts of herbs, bee products and other biological matrices are presented as alternative antioxidant compounds because these matrices have bioactive compounds that directly or indirectly inhibit the excess free radicals and lipid peroxidation of food. Thus this study evaluated the bioactive properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*), sage (*Salvia officinalis*), Basil (*Ocimum basilicum*) and Organic Bee Pollen and its implications as natural antioxidants during storage of chicken pate as an alternative to commercial antioxidant sodium erythorbate. The plant extracts and pollen show promise antioxidants have significant results in relation to phenolic compounds and flavonoids. Among the methods of antioxidant activity extract of rosemary and sage stood out in some analyzes showing results superior to commercial antioxidants. In relation to lipid oxidation, there was no formation of peroxides in any formulation during storage of the product. In TBARS analysis, which was performed during 28 days of storage, the extracts were added in the same concentration as antioxidant sodium erythorbate, wherein the extract of rosemary and sage behaved similarly to the commercial antioxidant.

Keywords: Natural antioxidants, rosemary, sage, basil, bee pollen, sodium erythorbate, substitution, chicken pate, lipid oxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Consumo per Capita (kg/hab) da carne de frango no Brasil	17
Figura 2 - Etapas da oxidação lipídica em alimentos	21
Figura 3- Reações de oxidação e redução na titulação iodométrica	23
Figura 4- Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído formando o composto cromogênio	25
Figura 5- Mecanismo de ação de antioxidantes primários	26
Figura 6 - Estrutura dos antioxidantes sintéticos.....	28
Figura 7 - Estrutura química do Isopreno	29
Figura 8 - Estrutura química de um fenol simples	30
Figura 9 – Alecrim	31
Figura 10 – Sálvia	32
Figura 11 – Manjeriço.....	33
Figura 12- Pellets de Pólen Apícola	34
Figura 13- Reação de captura do radical DPPH.	36
Figura 14- Redução do ABTS•+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio	38
Figura 15 - Redução do Fe (III) a Fe (II) pela adição de um antioxidante	39
Figura 16 - Esquema geral para preparo de patê de frango	48
Figura 17- Cinética do potencial antioxidante do EEA pelo método de DPPH.....	55
Figura 18 - Cinética do potencial antioxidante do EES pelo método de DPPH.....	55
Figura 19- Cinética do potencial antioxidante do EEM pelo método de DPPH.	56
Figura 20- Cinética do potencial antioxidante do EEP pelo método de DPPH.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Formulação da massa controle para Patê de Frango	47
Tabela 2 - Teor de compostos fenólicos totais e flavonóides nos extratos de alecrim, sálvia, manjerição e pólen.....	52
Tabela 3 - Atividade de sequestro do radical DPPH: EC ₅₀ e porcentagem de atividade antioxidante.....	57
Tabela 4 - Atividade de sequestro do radical DPPH quantificação através do trolox	59
Tabela 5- Atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico.....	60
Tabela 6- Atividade antioxidante equivalente ao Trolox pelo método ABTS ^{•+}	62
Tabela 7- Atividade antioxidante pela redução do ferro (FRAP)	63
Tabela 8 - Valores médios de TBARS nos diferentes tratamentos de patê de frango durante o período de armazenamento	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

BHT	Butil-hidroxitolueno
BHA	Butil-hidroxianisol
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
IP	Índice de peróxido
MDA	Malonaldeído
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
EAG	Equivalente em ácido gálico
PG	Propil galato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
TEP	1,3,3-tetraetoxipropano
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
EC ₅₀	Coeficiente de inibição (concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH•)
P.A	Puro Absoluto
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
EEA	Extrato etanólico de Alecrim
EES	Extrato etanólico de Sálvia
EEP	Extrato etanólico de Pólen
EEM	Extrato etanólico de manjeriço
mEq/kg	Miliequivalentes por quilograma de amostra
% AA	Atividade Antioxidante (%)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 O MERCADO DA CARNE DE FRANGO.....	17
3.2 A CARNE DE FRANGO	18
3.3 PRODUTOS ELABORADOS A PARTIR DA CARNE DE FRANGO	19
3.3.1 O patê.....	20
3.4 OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CARNES	21
3.5 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA	23
3.5 ANTIOXIDANTES	26
3.5.1 Antioxidantes Comerciais	27
3.5.2 Antioxidantes Naturais.....	29
3.5.3 Métodos de Avaliação de Atividade Antioxidante	35
3.5.3.1 Método do sequestro do radical livre DPPH.....	36
3.5.3.2 Auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	37
3.5.3.3 Atividade antioxidante pelo método de ABTS ^{•+}	37
3.5.3.4 Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro – FRAP	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 MATERIAIS	40
4.1.1 Aquisição da matéria prima	40
4.1.2 Processamento das amostras	40
4.2 MÉTODOS	40
4.2.1 Preparo dos extratos etanólicos alecrim (EEA), sálvia (EES) e manjerição (EEM)	40
4.2.2 Preparo do extrato de pólen apícola (EEP)	41
4.2.3 Preparo dos extratos para aplicação no produto	41
4.2.4 Determinação de compostos fenólicos totais	42
4.2.5 Determinação de flavonoides totais.....	42

4.2.6 Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH [•] (2,2 difenil-1-picridrazina)	43
4.2.7 Atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico	45
4.2.8 Atividade antioxidante pelo método ABTS ^{•+}	46
4.2.9 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro – FRAP	46
4.2.10 Elaboração do produto	47
4.2.11 Índice de peróxido	49
4.2.12 Teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
5.1 TEOR DE COMPOSTOS FÊNOLICOS E FLAVÓNOIDES TOTAIS.....	52
5.2 ATVIDADE ANTIOXIDANTE MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH [•] (2,2 DIFENIL-1-PICRIDRAZINA).....	54
5.2.1 Coeficiente de inibição EC ₅₀ e porcentagem de inibição	54
5.2.2 Atividade antioxidante expressa em referencia ao Trolox	59
5.3 ATVIDADE ANTIOXIDANTE PELO SISTEMA B-CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO	60
5.4 ATVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS ^{•+}	61
5.5 ATVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO – FRAP.....	63
5.6 INDICE DE PERÓXIDO	64
5.7 ANÁLISE DE TBARS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
6 CONCLUSÃO	67
7 REFERENCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

Dentro da indústria processadora de carnes e seus derivados, a complexidade do processamento de alimentos, associada à necessidade de aumentar o período de armazenamento destes torna-os vulneráveis a deterioração a qual é ocasionada por reações químicas, como a oxidação lipídica.

Estas reações geram compostos como aldeídos, cetonas, ácidos graxos de cadeia curta, que se tornam indesejáveis por serem os agentes responsáveis pela destruição de constituintes essenciais, ocasionando o decréscimo do valor nutricional dos alimentos; por gerar compostos tóxicos para o organismo humano, tornando-o impróprio para o consumo; e principalmente por alterar as características organolépticas do produto, limitar sua vida de prateleira e a sua estabilidade comercial (BRUM, 2009; KAHL, HILDEBRANDT, 1986; PADILHA, 2007; SOUZA, 2006; TERRA, 2008; YUNES, 2010).

Portanto, para evitar tais inconvenientes a indústria de carnes utiliza substâncias químicas capazes de fornecer proteção contra a oxidação, os chamados antioxidantes comerciais, como o BHA (butil-hidroxianisol), BHT (butil-hidroxitolueno) e eritorbato de sódio.

Porém a indústria de alimentos tem-se deparado com o desafio de elaborar e produzir produtos que apresentem características sensoriais e nutricionais atraentes para a comercialização e que ao mesmo tempo satisfaça os consumidores que exigem a adoção de uma política decrescente de uso de conservantes sintéticos, uma vez que o consumo exagerado destes está relacionado a diversas doenças carcinogênicas.

Neste cenário os antioxidantes naturais oriundos de ervas aromáticas, produtos apícolas, frutas, verduras e demais matrizes biológicas se apresentam como alternativas aos antioxidantes comerciais, por possuir compostos bioativos que inibem direta ou indiretamente o excesso de radicais livres e a peroxidação lipídica dos alimentos.

Deste modo este trabalho objetivou avaliar as propriedades bioativas do Alecrim (*Rosmarinus officinalis*), Sálvia (*Salvia officinalis*), Manjericão (*Ocimum basilicum*) e Pólen Apícola Orgânico e suas implicações como antioxidantes naturais

durante o armazenamento de patê de frango, em alternativa ao antioxidante comercial eritorbato de sódio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem por objetivo determinar as propriedades bioativas do Alecrim (*Rosmarinus officinalis*), Sálvia (*Salvia officinalis*), Manjeriço (*Ocimum basilicum*) e Pólen Apícola, bem como, verificar suas implicações como antioxidantes naturais durante o armazenamento de patê de frango, em alternativa ao antioxidante comercial eritorbato de sódio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais nos extratos etanólicos de alecrim, sálvia, manjeriço e pólen apícola.
- Verificar o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos etanólicos e dos antioxidantes comerciais BHA, BHT, α -tocoferol e eritorbato de sódio pelo método de sequestro de radical livre DPPH[•], captura do radical ABTS^{•+}, oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico e pelo poder de redução do ferro - FRAP.
- Formular e produzir diferentes tratamentos de patê de frango, utilizando como antioxidantes naturais os extratos de alecrim, sálvia, manjeriço e pólen apícola, separadamente, e um tratamento padrão com antioxidante sintético eritorbato de sódio e um controle sem adição de antioxidante.
- Verificar o efeito dos extratos na estabilidade oxidativa do produto elaborado, através de análises como índice de peróxido e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS, comparando-o com o tratamento controle e padrão.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O MERCADO DA CARNE DE FRANGO

Na década de 60, teve início nos países industrializados à tendência da substituição do consumo de carnes vermelhas por carnes brancas, em decorrência do baixo custo da carne de frango quando comparado ao de outras proteínas animais (COUTINHO; FERRAZ, 1993; SATO, 1995).

Essa tendência de consumo passou a ser observada no Brasil nas décadas de 70 e 80 e desde então, a ingestão da carne de frango, pelos brasileiros, só aumentou. Fatores como, o menor valor para aquisição, presença de gordura em níveis inferiores as demais carnes e oferta de cortes prontos e temperados que oferecem praticidade ao consumidor, estão relacionados à tendência no aumento de consumo da carne de frango.

Na figura 1 estão apresentados os dados referentes ao consumo da carne de frango no pelos brasileiros entre os anos de 2000 e 2011.

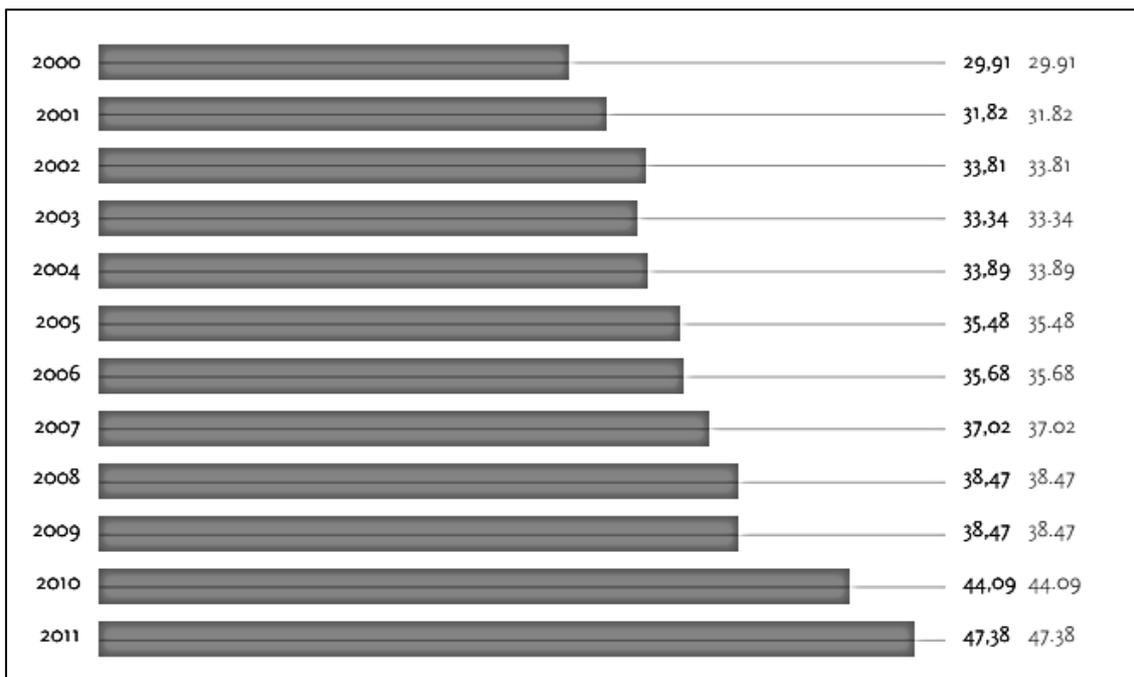


Figura 1- Consumo per Capita (kg/hab) da carne de frango no Brasil

Fonte- União Brasileira de Avicultura, 2012.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) censo de 2013, o Brasil é o maior exportador de carne de frango desde 2004 e o terceiro maior produtor de carne de aves, atrás somente de Estados Unidos e China (IBGE, 2013).

Os estados da Região Sul juntos abateram 59,0% do total do abate nacional, mais do que o dobro da participação da Região Sudeste (21,2%). Destaca-se o estado do Paraná como principal Unidade da Federação no ranking nacional de abate de frangos, com participação de 28,0%, seguida de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (IBGE, 2013).

A trajetória de sucesso da avicultura brasileira foi desencadeada por uma série de fatores que juntos contribuíram para que esta atividade se tornasse uma das mais interessantes dentre as cadeias produtivas agroindustriais no Brasil e uma das mais desenvolvidas no mundo. Marcada por constantes evoluções técnicas, o triunfo desta produção pode ser explicado pelo desenvolvimento de pesquisas em genética, o rigoroso controle das sanidades avícolas, as privilegiadas condições de produção de grãos, clima extremamente favorável, o aperfeiçoamento dos profissionais da atividade e a otimização dos processos industriais e dos equipamentos utilizados (SCHEEREN, 2011).

As indústrias de maior porte utilizam linhas de abate automatizadas de grande escala, permitindo assim a produção de cortes de frango, com alto grau de padronização, oferecendo ao mercado um produto com maior valor agregado (SCHEEREN, 2011).

3.2 A CARNE DE FRANGO

Considerada um alimento saudável, a carne de frango constitui uma fonte importante de proteínas, as quais têm, por conseguinte, um bom valor biológico que é comparável ao das outras carnes. A carne de frango é rica em ferro e vitaminas do complexo B, em especial niacina (músculo escuro) e riboflavina (músculo claro). Além de possuir várias proteínas indispensáveis ao ser humano, a carne de frango também é uma fonte de energia e de outros nutrientes como vitaminas, minerais e lipídeos (VENTURINI et al, 2007).

No Brasil a carne de frango pode ser comercializada como frango inteiro e frango em carcaça, e os resíduos gerados durante o processamento e a abate podem ser empregados na produção de outros produtos (VENTURINI et al, 2007).

3.3 PRODUTOS ELABORADOS A PARTIR DA CARNE DE FRANGO

Dentre os produtos elaborados a partir da carcaça do frango, estão inseridos a linguiça frescal, medalhões, peito de frango defumado, entre outros, enquanto os produtos elaborados a partir dos subprodutos do processamento do frango, destacam-se os empanados, em molho, reestruturados e em pastas.

Segundo a Instrução Normativa n.4, de 31 de março de 2000 que aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada, de mortadela, de linguiça e de salsicha, entende-se por linguiça o produto cárneo industrializado obtido de carnes de animais de açougue, adicionado ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial e submetido ao processo tecnológico adequado.

Os produtos empanados podem ser definidos, como o produto cárneo industrializado, obtido a partir de carnes de diferentes espécies de animais de açougue, acrescido de ingredientes, moldado ou não, e revestido de cobertura apropriada que o caracterize, nesta categoria encontram-se os *nuggets* (BRASIL, 2001).

Enquanto os produtos em molho são partes de frango picadas, pré-cozidas e adicionados a molhos. Podendo ser elaborados com cortes lesionados que estão fora dos padrões dimensionais da empresa, como também, produtos obtidos de desossa com resíduos de carne aderida, porém, com a granulometria um pouco maior do que a recomendada para produtos reestruturados (ROQUE, 1996).

De forma geral, os produtos reestruturados são elaborados a partir de porções cárneas magras e gordas, cortadas em pedaços medianos e/ou triturados, sendo reduzidos a uma pasta fina. Geralmente são comercializados como produtos crus (refrigerados ou congelados) ou como pré-cozidos ou cozidos, como o hambúrguer, os empanados, salsichas e mortadelas (GAVA, SILVA E FRIAS, 2008).

Os produtos em pasta, segundo definição do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, são considerados produtos cárneos industrializados cozidos, pasteurizados ou esterilizados, obtidos a partir de carnes e/ou produtos cárneos e/ou miúdos comestíveis, das diferentes espécies de animais de açougue, transformados em pasta, adicionado de ingredientes e submetido a um processo térmico adequado, dentre os produtos elaborados neste grupo, encontram-se os patês (BRASIL, 2000).

3.3.1 O patê

O patê é um produto cárneo com tradições gastronômicas importantes e se destaca devido as suas características sensoriais. Não existem dados exatos na história sobre a origem da elaboração e consumo de patês, porém sabe-se que os primeiros eram feitos de fígado de patos que migravam no inverno para as margens do Nilo, nesta época o patê era um alimento requintado servido somente aos faraós.

Os primeiros patês a serem comercializados foram os de fígado de ganso (*foie-grass*) e fígado de porco.

No Brasil, o regulamento técnico que define a qualidade e identidade do patê é a Instrução Normativa Nº 21, de 31 de julho de 2000, onde entende-se por Pasta ou Patê, seguido das especificações que couberem, o produto cárneo industrializado obtido a partir de carnes e/ou produtos cárneos e/ou miúdos comestíveis, das diferentes espécies de animais de açougue, transformados em pasta, adicionado de ingredientes e submetido a um processo térmico adequado (BRASIL, 2000).

Os patês podem ser classificados em cremosos e pastosos. O patê cremoso é produzido com parte da matéria-prima crua e outra cozida, enquanto o patê pastoso é processado com a matéria-prima cozida (SCHMELZER-NAGEL, 1999).

3.4 OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CARNES

Entre os componentes básicos da carne, a gordura é o mais variável, tanto no ponto de vista quantitativo como qualitativo. Os lipídios presentes na carne e em seus derivados desempenham um papel determinante para a aceitação dos mesmos, uma vez que a sua concentração e composição influenciam intensamente nas propriedades organolépticas dos produtos. Entretanto, os lipídios estão suscetíveis ao processo de oxidação, o qual é o principal responsável pela perda da qualidade sensorial e nutricional da carne e de seus produtos (ORDÓÑEZ, 2005.; PINO 2005).

Fatores como a composição de fosfolipídios, o teor de ácidos graxos poli-insaturados, presença de íons de metais livres, processos mecânicos como moagem, mistura, corte desossa, cocção intensificam o processo de oxidação lipídica da carne e derivados (ALMEIDA, 2005).

A oxidação lipídica acontece basicamente em três etapas, sendo elas iniciação, propagação e término.

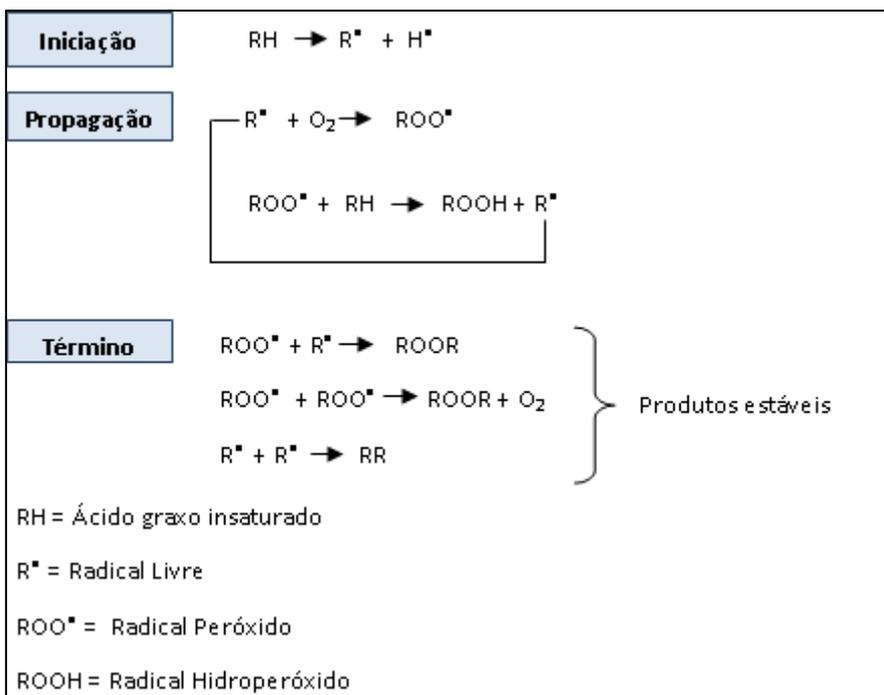


Figura 2 - Etapas da oxidação lipídica em alimentos

Fonte: Ramalho e Jorge, 2006.

Na fase de iniciação, um átomo de hidrogênio é retirado do grupo metílico de um ácido graxo insaturado, formando-se assim um radical livre $R\cdot$. Nesta fase a energia de ativação é bastante elevada, desta forma há certa dificuldade da reação iniciar-se de forma espontânea, necessitando, assim, de temperaturas elevadas e agentes catalisadores, como a luz e a presença de certos metais (cobre, ferro, níquel, cobalto e manganês). Na segunda fase, a de propagação, os radicais livres formados na primeira fase, reagem com oxigênio produzindo peróxidos que por sua vez subtraem o hidrogênio de outra molécula insaturada, produzindo hidroperóxidos e mais um novo radical livre, promovendo assim uma reação em cadeia, estas reações só cessam na etapa de término. Nesta fase, as alterações no sabor e no aroma do alimento tornam-se perceptíveis devido aos produtos de decomposição dos hidroperóxidos. No término, ocorre a interrupção das reações de propagação devido ao consumo e redução dos ácidos graxos insaturados, desta forma os radicais livres associam-se formando substâncias estáveis e finalizando seu papel como agentes oxidantes. As características organolépticas do alimento, nesta fase, são intensamente alteradas, sendo facilmente perceptível a rancificação através do aroma e do sabor (ORDÓÑEZ, 2005).

Segundo Andersen et al. (2003), Morrisey et al. (1998) e Padilha (2007) “a oxidação lipídica em carnes de aves, envolve os lipídios poli-insaturados das membranas celulares e está relacionada também com a oxidação dos pigmentos das carnes, provocando perda da cor”. As alterações bioquímicas que acompanham a conversão do músculo em carne oferecem condições favoráveis para que ocorra a oxidação na fração mais insaturada de fosfolipídios nas membranas sub-celulares, onde o balanço entre os fatores pró-oxidativo e a capacidade antioxidativa não está controlado, favorecendo a oxidação lipídica, que pode ser acelerada por processamento tecnológico anterior à estocagem como o corte e o cozimento, os quais rompem as membranas celulares do músculo (ANDERSEN et al., 2003.; MORRISEY et al., 1998; PADILHA, 2007).

3.5 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA

Existem diferentes formas de se avaliar o estado oxidativo de frações lipídicas dos alimentos. Dentre os testes mais utilizados estão o índice de peróxido e determinação substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esses métodos geralmente envolvem a extração da fração lipídica do alimento em estudo seguido de análise (SOARES et al., 2012).

3.4.1 Índice de Peróxido (IP)

A medida do índice de peróxido é bastante utilizada para determinar os produtos primários da oxidação, os hidroperóxidos, os quais podem ser quantificados com base na propriedade de oxidar íons de Fe^{2+} a Fe^{3+} ou de liberar iodo (AOCS, 2004).

O método mais empregado é o iodométrico, no qual a extração da fração lipídica do alimento ocorre através da reação com clorofórmio e a quantificação do teor de peróxido baseia-se na proporção direta que há entre iodo liberado na reação e quantidade de peróxido presente na amostra.

A figura 3 exemplifica as reações decorridas no método iodométrico.

Os peróxidos que são formados no início da rancificação, devido a sua ação oxidante, atuam sobre o iodeto de potássio liberando o iodo, a quantificação desses compostos é realizada com uma solução de tiosulfato de sódio, e os valores expressos em miliequivalentes de peróxido por kg de amostra (SILVA, BORGES, FERREIRA, 1998).

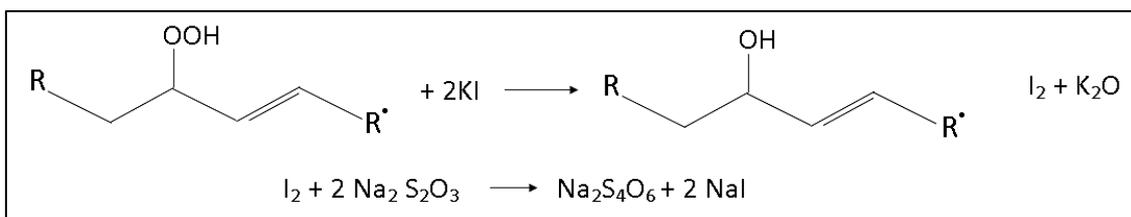


Figura 3- Reações de oxidação e redução na titulação iodométrica
 Fonte: SILVA, BORGES, FERREIRA (1998).

A medida do índice de peróxido reflete a qualidade do alimento mesmo que os ácidos graxos encontrem-se na fase inicial de oxidação, entretanto, este método não fornece o valor total de peróxidos presentes na amostra, pois o iodo liberado pode fixar-se nas duplas ligações dos ácidos graxos polienólicos causando um decréscimo ao valor de índice de peróxido, outro ponto que se deve considerar é a interação do iodeto com o oxigênio atmosférico (VOGEL, 1992; SILVA, BORGES, FERREIRA, 1998).

Assim, como complemento ao IP pode se realizar o teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e testes de análise sensorial.

3.4.2 Índice de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é utilizada como indicador do grau de oxidação lipídica, quantificando o malonaldeído (MDA), um dialdeído com três carbonos, um dos principais produtos formados durante o processo oxidativo do alimento e caracterizados como tóxico devido à degradação dos ácidos graxos (DOTAN; LICHTENBERG; PINCHUK, 2004; KIRSCHNIK; MACEDO-VIEGAS, 2009).

Este método está baseado na quantificação do grau de oxidação lipídica no alimento, partindo do princípio que os produtos primários desta oxidação constituem-se principalmente de hidroperóxidos, os quais são rapidamente decompostos em várias substâncias, dentre elas o malonaldeído, que sob aquecimento e na presença do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) reagem formando um complexo cromogênio vermelho, indicador de gordura oxidada, o qual pode ser identificado espectrofotometricamente na região de 500 à 550 nm (CECCHI, 1999; OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005).

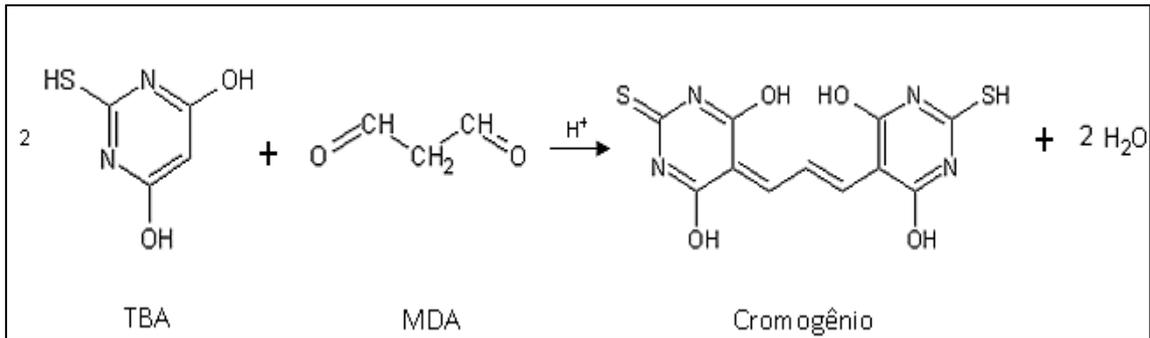


Figura 4- Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído formando o composto cromogênio

Fonte: Osawa; Felício; Gonçalves (2005).

O método empregado neste trabalho baseia-se no princípio descrito acima, porém para a realização deste são empregados antioxidantes nos processos de filtração e extração da fração lipídica do alimento. Através da hidrólise ácida, realizada com ácido tricloroacético (TCA) juntamente com propil galato (PG) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), o malonaldeído presente na amostra é liberado e em reação com o TBA forma o cromogênio. O meio ácido juntamente com a temperatura elevada aumentam a velocidade e a sensibilidade da reação. A adição de um antioxidante e de um agente quelante como o EDTA evita a formação errônea de malonaldeído ou outras substâncias reativas ao TBA durante a mistura e filtração da amostra (OSAWA et al, 2005; VYNCKE, 1970).

Para a quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico é necessário construir uma curva de calibração com concentrações conhecidas de malonaldeído, usualmente utiliza-se o como 1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) como padrão, o qual sob condições de hidrólise ácida resultam na liberação do malonaldeído e etanol (SILVA et al, 1999).

Apesar da análise de TBARS ser, particularmente, relevante quando introduzida em carnes, pescados e principalmente em derivados, pois processos como moagem, mistura e cozimento favorecem a formação do malonaldeído, sendo fundamental o emprego do teste na avaliação da qualidade do produto final, para empregar-se este teste, é importante conhecer a composição em ácidos graxos do alimento em análise, uma vez que o teste mede a extensão da oxidação de lipídios com três ou mais duplas ligações. Para sistemas mais complexos, em que estão presentes misturas de constituintes, a medida de TBA tem apenas significado

qualitativo e comparativo, embora seja de grande utilidade na comparação de um único material em diferentes estágios de oxidação (OSAWA et. al, 2005)

3.5 ANTIOXIDANTES

Segundo a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), antioxidantes são substâncias empregadas para preservar e estender a vida de prateleira de alimentos que contém lipídios através de ações como o retardo da deterioração, rancidez e descoloração decorrentes da auto-oxidação (SOUZA et al., 2007).

Os antioxidantes podem atuar de diversas maneiras, sejam elas, ligando-se competitivamente ao oxigênio, retardando a etapa de iniciação, interrompendo a etapa de propagação pela destruição ou pela ligação de radicais livres, inibindo os catalisadores ou estabilizando os hidroperóxidos (OETTERER, 2006).

Essas substâncias podem ser classificadas em primárias ou secundárias dependendo da maneira que atuam sobre os radicais livres.

As primárias promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de elétrons ou de hidrogênio a estes radicais, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis, ou também podem reagir com radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que, por sua vez, pode reagir com outro radical livre (MILANI et al 2002; RAMALHO, JORGE 2006).

A figura 5 ilustra o mecanismo de ação desses antioxidantes. O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante (AH) é sequestrado pelos radicais livres R^* e ROO^* , assim formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e um radical relativamente estável (A^*) procedente do antioxidante (RAMALHO, JORGE 2006).

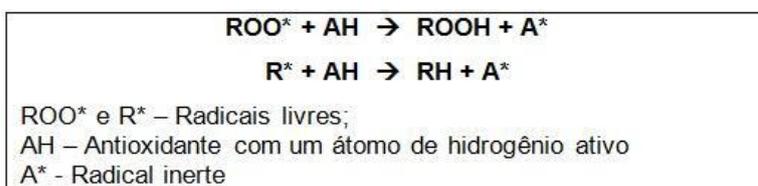


Figura 5- Mecanismo de ação de antioxidantes primários
 Fonte: Ramalho;Jorge (2006)

Neste grupo estão inseridos os antioxidantes comerciais como butil-hidroxitolueno (BHT), butil-hidroxi-anisol (BHA), e os antioxidantes naturais como os tocoferóis, componentes derivados da vitamina E e os compostos fenólicos (MILANI et al., 2002).

Nos antioxidantes secundários existem diferentes mecanismos de reação que incluem complexação com metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos, entre outros, porém eles não convertem radicais livres em compostos estáveis (GORDON, 1990).

Eles são capazes de quelar metais pro-oxidantes e desativá-los, doar átomos de hidrogênio a antioxidantes primários e decompor hidroperóxidos em espécies não radicais, desativar o oxigênio singlete e agir como suspensores de oxigênio. Comumente são referidos como agentes sinérgicos, pois atuam em conjunto aos antioxidantes primários (OETTERER, 2006)

3.5.1 Antioxidantes Comerciais

Os antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxianisol (BHA – INS 320), butil-hidroxitolueno (BHT–INS 321), Galato de Propila (GP–INS 310) e eritorbato de sódio (INS 316) são amplamente usados como aditivos alimentares a fim de aumentar a vida útil dos alimentos, especialmente das carnes e dos produtos cárneos.

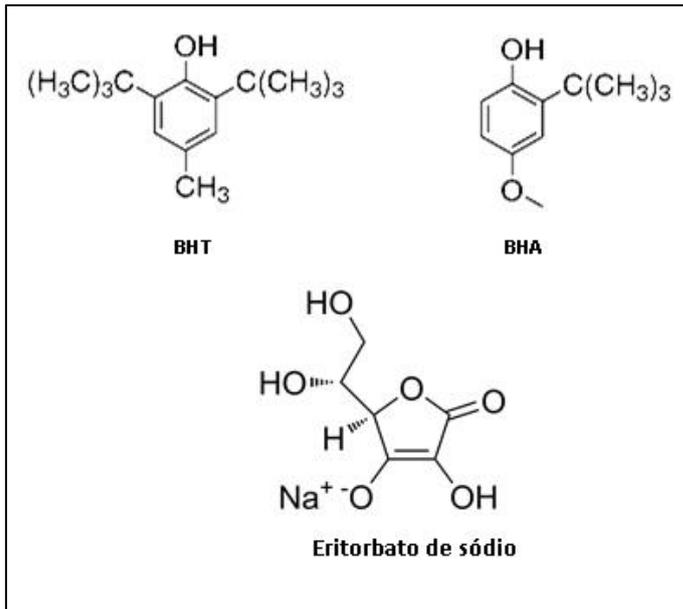


Figura 6 - Estrutura dos antioxidantes sintéticos

Fonte – Autor desconhecido (2014)

O BHA é um antioxidante primário largamente utilizado em alimentos pois apresenta a propriedade retardar, principalmente, a oxidação da vitamina A, gorduras e óleos insaturados e sementes. Apresenta pouca estabilidade frente a elevadas temperaturas, mas é particularmente efetivo no controle de oxidação de ácidos graxos de cadeia curta (REPORT ON CARCINOGENS, 2011; BAILEY, 1996).

O BHT apresenta propriedades similares ao BHA, entretanto difere-se por não agir como sinergista no propil galato. Quando empregados juntos, o BHA e o BHT atuam como sinergistas entre si, onde o primeiro age como sequestrante de radicais peróxidos e o segundo como sinergista, ou regenerador de radicais (OMURA, 1995).

O eritorbato de sódio, devido a sua estrutura, é um forte agente redutor com a função de prevenir ou minimizar as reações oxidativa, quando aplicado em concentrações acima de 100 ppm, caso contrario, em concentrações mais baixas pode acelerar o desenvolvimento da rancidez, provocando, assim, alterações no sabor e a cor dos alimentos (GRAY; PEARSON, 1987).

Segundo a Greats Foods Brasil (2009) quando este antioxidante é empregado em carne processada, tais como as salsichas e *beef sticks*, ele reduz a taxa na qual o nitrato reduz-se a óxido nítrico, conservando a coloração rósea do alimento (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009.; Greats Foods Brasil, 2009).

Em decorrência dos efeitos deletérios ao organismo humano uso e o limite do emprego dos antioxidante nos alimentos passou a ser regulamentado. No Brasil a Instrução Normativa nº 51, de 29 de dezembro de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), limita-se o uso de BHA, do BHT e do GP em 0,1 g/kg em produtos cárneos industrializados frescos embutidos ou não embutidos, enquanto o uso do eritorbato de sódio não é limitado (BRASIL, 2006).

3.5.2 Antioxidantes Naturais

Nos vegetais, a capacidade antioxidante está relacionada com os compostos de baixo peso molecular que eles apresentam em sua constituição. Esses compostos por serem considerados não-funcionais, ou seja, não estão diretamente relacionados a processos como fotossíntese, respiração, etc. denominam-se metabólitos secundários (ARAUJO, 2008).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos nitrogenados e os compostos fenólicos.

Os terpenos destacam-se por atuarem nos processos de comunicação e defesa, como atrativos, polinizadores, dispersores de sementes, competitivos de fitoxinas, antibióticos e repelentes de herbívoros e toxinas, são derivados do isopreno (C5) e são classificados em monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (DEWICK, 2009; HARBORNE, 1993).

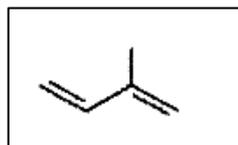


Figura 7 - Estrutura química do Isopreno

Fonte: Nunes et al, 2000.

Estes compostos podem ser encontrados em frutas e vegetais, e é em grande parte responsável pelo aroma agradável destes, como o odor característico

da laranja e do limão. Dentre os terpenos o mais difundido é o caroteno, que está presente principalmente em frutas que apresentam coloração vermelha, laranja e amarela.

Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido malônico. Quimicamente são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al, 2005).

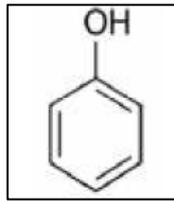


Figura 8 - Estrutura química de um fenol simples
Fonte: Lee et al, 2005.

Esses compostos podem ser classificados de acordo com a sua cadeia carbônica principal, sendo distribuídos em três classes principais, os flavonóides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (ANGELO; JORGE, 2007).

Os flavonoides e isoflavonóides são grupos de compostos fenólicos antioxidantes encontrados nos alimentos na forma glicosídica, o que os torna menos reativos aos radicais livres e mais solúveis em água. Entre os compostos fenólicos encontrados em grãos e óleos estão os tocoferóis, considerados fontes de vitamina E e os tocotrienóis, conhecidos como inibidores da síntese do colesterol. Os fenóis ácidos, como o ácido benzoico e cinâmicos são encontrados abundantemente em grãos e oleaginosas (ARAUJO, 2008).

Por desempenharem papéis fundamentais nas plantas, os compostos fenólicos são essenciais para o seu crescimento e reprodução, sendo formados sob condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Os compostos nitrogenados geralmente apresentam alto grau de toxicidade, entretanto destacam-se pelas suas propriedades medicinais. São derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina), os quais derivam do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina e lisina) (BERGAMASHI, 2010).

Neste grupo estão inseridos os alcaloides e glicosídeos cianogênicos, agentes responsáveis pela ação protetora do vegetal.

3.5.2.3 Alecrim

O alecrim, *Rosmarinus officinalis*, é uma planta perene e aromática que pertence à família das *Lamiaceae* é utilizado principalmente na culinária, e durante muito tempo foi utilizada de forma empírica e intuitiva, para fins terapêuticos e a partir do avanço da ciência passou incorporar as diferentes especialidades da pesquisa relacionada à comprovação da segurança à eficácia de seu uso (LEITE, 2009; RIBEIRO, et al, 2012).

Nativo da região do Mediterrâneo, o alecrim cujo nome é derivado do latim *rosmarinus*, possui porte lenhoso e ereto e pouco ramificado podendo atingir 1,5 m de altura. As folhas apresentam abundância em aromar, e em geral medem de 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura (LEITE, 2009).



Figura 9 – Alecrim

Fonte: Autor desconhecido (2014)

No processamento de alimentos, o alecrim é uma das especiarias mais utilizadas, e ainda é a única especiaria comercialmente disponível para o uso como

antioxidantes na Europa e nos Estados Unidos. Algumas pesquisas indicam que esta planta demonstra um ótimo potencial antioxidante o qual pode ser atribuído à presença de compostos como rosmanol, diterpenos rosmaridifenol e rosmariquinona (DOSSIÊ ANTIOXIDANTES, 2009).

3.5.2.4 Sálvia

A sálvia (*Salvia officinalis*) pertence a família das *Lamiaceae* e tem sua origem no mediterrâneo entretanto adaptou-se bem as condições climáticas da região Sul do Brasil. É utilizada como tempero e em alimentos para incrementar o sabor, mas também tem seu emprego difundido na indústria farmacêutica e cosmética (POVH, et al 2008; ANTIOXIDANTES NATURAIS,2014).



Figura 10 – Sálvia

Fonte: Autor desconhecido (2014)

Os seus extratos destacam-se por apresentar efeitos biológicos notáveis, como antibacteriana, fungicida, antioxidante e analgésico e apresenta atividades terapêuticas contra várias doenças (KOZICS, et al 2013).

Muitos estudos indicam que as propriedades antioxidantes dos extratos de sálvia pertencem a diversos compostos, principalmente os fenólicos, diterpenos, triterpenos, ácidos fenólicos, e os flavonoides. Os derivados de ácido cafeíco e ácido

rosmarínico são os principais responsáveis pelo efeito da atividade antioxidantes dos extratos de sálvia (FARHAT, et al 2014).

3.5.2.5 Manjericão

O manjericão, *Ocimum basilicum*, pertencente à família *Lamiaceae* é uma erva popularmente utilizada na culinária e tem sua origem na Índia, África e sul da Ásia. Antigamente, o manjericão era somente utilizado na culinária, hoje seu emprego s está associado as formulações de fragrâncias comerciais, aromas e em de produtos alimentícios. Os extratos de manjericão são conhecidos por apresentarem propriedades sedativas e anticonvulsivas, antimicrobiana, antifúngica e antioxidante (KWEE et al, 2011, NGUYEN et al 2010).

Submetido à várias pesquisas o manjericão tem apresentado resultados satisfatórios em relação a sua atividade antioxidante, sendo esta associada ao compostos fenólicos que ele apresenta, principalmente ao ácido rosmarínico. Outros compostos fenólicos derivados do ácido cafeico, também estão associados à atividade antioxidante (KWEE et al, 2011, NGUYEN et al 2010).



Figura 11 – Manjericão

Fonte: Autor desconhecido (2014)

3.5.5.6 Pólen

Segundo a Normativa nº 03, de 19 de janeiro de 2001, o pólen apícola é definido como o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuada pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido no ingresso da colmeia (BRASIL, 2001).



Figura 12- Pellets de Pólen Apícola
Fonte: Do autor, 2014.

O pólen apícola tornou-se comercialmente interessante por agregar macronutrientes tornando-o um bom suplemento alimentar, principalmente devido às proporções bem equilibradas de proteínas, de lipídios e carboidratos que contém. A ingestão diária de pólen apícola pode regular funções intestinais, reduzir a fragilidade capilar e fornecer benefícios sobre o sistema cardiovascular, a visão e a pele (XUE et al., 2012).

Além das propriedades nutricionais, o pólen apícola tem se destacado no cenário científico devido as suas propriedades bioativas, como atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, imunológica e anti-carcinogênica, exercendo funções antioxidantes e inibindo a ação lesiva dos radicais livres (CARPES et al., 2007; NEVES; ALENCAR; CARPES, 2009).

3.5.3 Métodos de Avaliação de Atividade Antioxidante

O aumento no uso da avaliação da capacidade antioxidante em alimentos, produtos naturais, fármacos e cosméticos deu-se a partir da década de 90, quando começou a ser constatada a influência benéfica de muitos produtos naturais na saúde humana. Assim, tornou-se crescente também a busca e a validação de metodologias para a avaliação da atividade antioxidante em matrizes complexas como alimentos, produtos naturais e fluídos biológicos (SANCHEZ et al., 1998.; TOMEI, SALVADOR, 2007).

Desta maneira, diversas técnicas têm sido utilizadas para se determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma, a permitir rápida seleção de substâncias e/ou misturas promissoras (TIVERON, 2012).

Para a determinação da atividade antioxidante, normalmente, faz-se uso de dois métodos, os diretos e os indiretos.

Os métodos diretos baseiam-se no efeito que uma amostra contendo antioxidantes provoca sob a degradação oxidativa de um sistema em análise. Este sistema caracteriza-se pela presença da competição entre um objeto oxidável e o antioxidante através de radicais gerados por uma fonte promotora de radicais livres. Essa abordagem apresenta determinadas limitações, pois os métodos empregados são sensíveis e tempo-dependentes, o que sugere que suas aplicações requerem experiência em reações de cinética química. Dentre essa abordagem, está inserido o método de oxidação do β -caroteno/ácido linoléico (ROGINSKI, LISSI, 2005.; TOMEI, SALVADOR, 2007).

Por sua vez, os métodos indiretos são caracterizados por reações de transferências de elétrons que acontecem entre um agente oxidante e o antioxidante. Nestas reações de oxi-redução, o substrato oxidado forma cromogênios com diferentes bandas de absorção e a intensidade desta calorimetria é proporcional ou inversamente proporcional à atividade antioxidante dependendo do método empregado. Fazem-se presentes nesta série os métodos do sequestro do radical livre DPPH, redução do ferro FRAP, sequestro do radical ABTS, ensaio com reagente Folin-Ciocalteu, entre outros (BENZIE et al, 1999).

Segundo Tomei e Salvador (2007) métodos indiretos “são adequados, de fácil manipulação e, apesar de não apresentarem a mesma especificidade, também

permitem uma adequada avaliação da atividade antioxidante. No entanto, um impasse na aplicação dos métodos indiretos é a sua baixa reprodutibilidade, sendo a razão principal o fato dos resultados serem altamente dependentes da concentração de reagentes e do tempo de incubação”.

Devido às vantagens e limitações de cada método, torna-se criterioso e de maior confiabilidade analítica avaliar a capacidade antioxidante de uma amostra correlacionando diferentes abordagens.

3.5.3.1 Método do sequestro do radical livre DPPH

O ensaio do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) tornou-se bastante popular no estudo dos antioxidantes em produtos naturais e alimentos, por ser um método simples e altamente sensível.

A capacidade antioxidante medida pelo método DPPH baseia-se no princípio de que o DPPH, sendo um radical de coloração violeta, por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R^{\bullet}), é reduzida para se tornar uma molécula estável, que raramente pode ser oxidada irreversivelmente, 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, conforme descrito na figura 13. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 514 nm, que desaparece à medida que ele vai sendo reduzido pelo hidrogênio doado por um composto antioxidante (MENSOR et al., 2001).

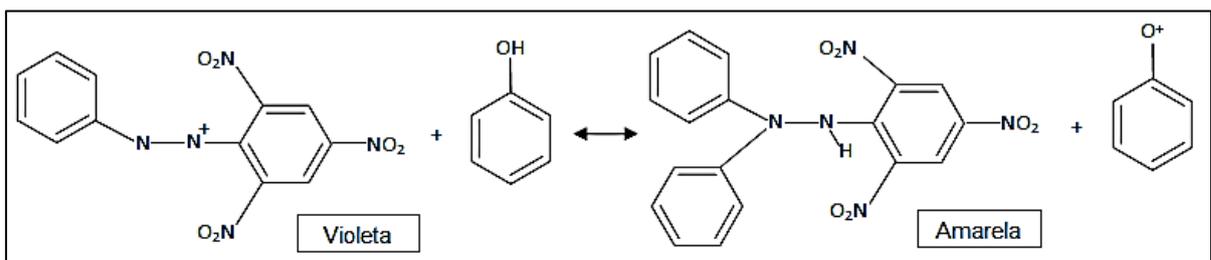


Figura 13- Reação de captura do radical DPPH.

Fonte - Cheng et al.,2003.

3.5.3.2 Auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico

A análise do β -caroteno/ácido linoléico é considerada como um método direto, uma vez que é baseada no estudo de alimentos contendo antioxidantes na oxidação degradativa de um sistema em teste. O substrato da oxidação pode ser lipídios individuais, mistura de lipídios (óleos), proteínas, DNA, entre outros (ROGINSKY; LISSI, 2005).

A medida da atividade antioxidante pelo método de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico consiste a um sistema modelo que ao ser submetido em condições de oxidação, gera um radical livre a partir da oxidação do ácido linoléico, que irá abstrair o hidrogênio da molécula insaturada do β -caroteno. Como resultado da oxidação desta molécula, o sistema perde a coloração alaranjada característica, que é monitorada espectrofotometricamente do modo a quantificar o grau de inibição da oxidação pelo antioxidante a ser testado (ABIDILLE et al, 2005).

Este método é amplamente utilizado principalmente por não recorrer a altas temperaturas, permitindo a determinação do poder antioxidante de compostos termossensíveis e a avaliação qualitativa de extratos vegetais (AMIN; NORAZAIDAH; HAINIDA (2006).

3.5.3.3 Atividade antioxidante pelo método de ABTS^{•+}

O método de sequestro do radical ABTS 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi primeiramente introduzido por Miller et al. (1993) e desde então tem sido amplamente utilizado na avaliação da atividade antioxidante em alimentos, bebidas, devido à sua aplicabilidade na fase aquosa e lipídica e por oferecer resultados reprodutíveis (MACDONALD- WICKS; WOOD; GARG, 2006).

Este método se assemelha com o de DPPH[•], ambos apresentam excelente estabilidade em determinadas condições de análise, no entanto radical DPPH[•] é solúvel em solventes orgânicos e é comercializado pronto para o uso, diferente do ABTS^{•+} que necessita ser gerado antes por reações químicas (como o persulfato de

potássio) ou enzimáticas (peroxidase de rábano-bastardo), e, é solúvel tanto em água como em solventes orgânicos, permitindo a análise tanto de amostras hidrofílicas como lipofílicas (ARNAO, 2000).

Este método está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion $ABTS^{\bullet+}$. O radical $ABTS^{\bullet+}$ estável, que tem uma absorção cromóforo azul-verde, é formado pela adição de persulfato de potássio. Na medida em que o antioxidante é misturado com esse radical, ocorre a redução do $ABTS^{\bullet+}$ à $ABTS$ (Figura 14), provocando a perda da coloração do meio reacional e consequentemente um decréscimo na absorbância, que pode ser monitorada pelo espectrofotometricamente no intervalo de 600-750 nm.

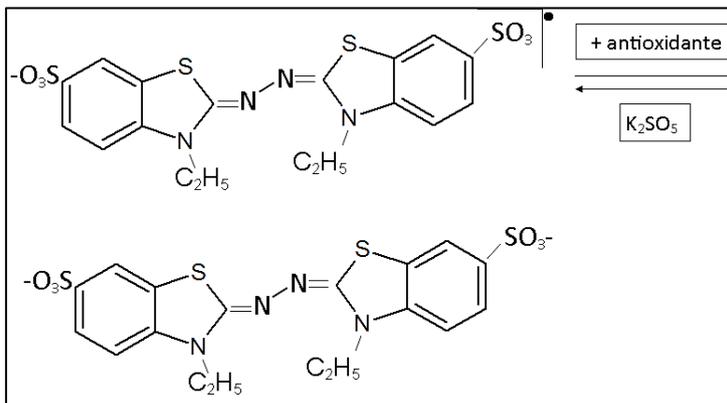


Figura 14- Redução do $ABTS^{\bullet+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio

Fonte: Huang; Ou; Prior, (2005)

3.5.3.4 Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro – FRAP

O poder Antioxidante de Redução do Ferro- FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) foi desenvolvido como uma alternativa para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis aqueles obtidos com outras metodologias mais complexas (PLUIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000; RUFINO et. al, 2006).

Este método está baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e sob condições ácidas. A reação ocorre, conforme demonstrado na figura 15, através da formação de um complexo TPTZ com o Fe (III), de cor amarelada, que sob um antioxidante reduz o ferro presente dando origem ao $[\text{Fe}(\text{II})(\text{TPTZ})_2]^{2+}$, de colocação azul escura, que apresenta uma absorção máxima a 593 nm (APAK et al., 2004)

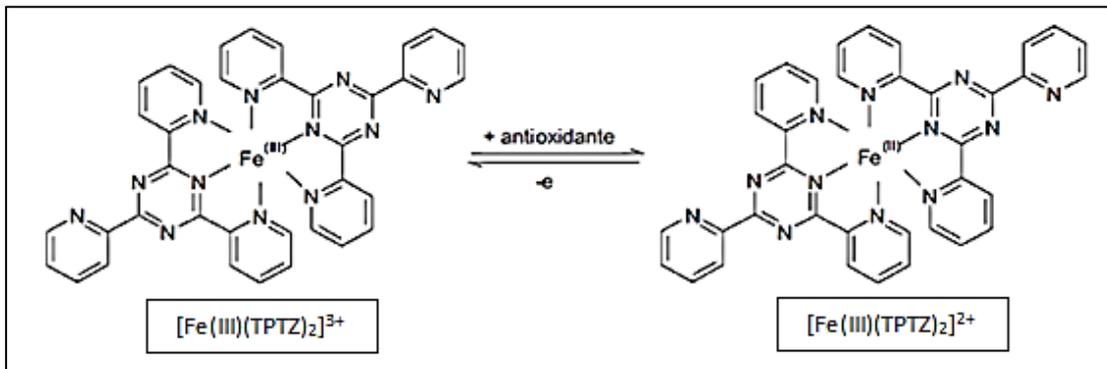


Figura 15 - Redução do Fe (III) a Fe (II) pela adição de um antioxidante

Fonte: Huang; Ou; Prior, (2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Aquisição da matéria prima

As amostras de Alecrim, Sálvia e Manjerição foram adquiridas na forma *in natura*, na Feira do Produtor Rural na cidade de Pato Branco – Paraná, no mês de outubro de 2013. A amostra de Pólen Apícola Orgânico Heterofloral foi gentilmente fornecida em sua forma desidratada pela empresa Breyer & Cia LDTA de União da Vitória – PR, do lote de setembro de 2011.

4.1.2 Processamento das amostras

A amostra de pólen apícola foi seca em estufa à 37 °C, afim de promover a retirada de água em excesso deste material já que este possui características higroscópicas. Este mesmo processo de secagem foi aplicado nas partes aéreas das plantas, logo após a colheita, com a finalidade de inativar enzimas através da remoção da água. Após o processo secagem, as amostras foram trituradas em moinho de bancada (Marconi modelo MA – 630), embaladas individualmente, e armazenadas sob congelamento até o momento do preparo dos extratos.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo dos extratos etanólicos alecrim (EEA), sálvia (EES) e manjerição (EEM)

Dois gramas de planta, previamente secas e moídas, foram extraídas com 15 mL de etanol 80% (v/v) em banho-maria à 70 °C durante 30 minutos. As soluções foram filtradas em papel filtro qualitativo e o filtrado obtido armazenado em tubos de ensaio com roscas à 0 °C, até a determinação dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais e demais análises de atividade antioxidante.

4.2.2 Preparo do extrato de pólen apícola (EEP)

O preparo do extrato de pólen apícola (EEP) foi realizado segundo estudos de SERAFINI et al. (2012). Dez gramas do pólen, previamente desidratado e moído, foram extraídas com 100 mL de etanol 80% (v/v), homogeneizadas em incubadora *Shaker* à 40 °C por 60 minutos a 150 rpm. O líquido foi filtrado em papel filtro qualitativo e armazenado em tubos de ensaio com roscas à 0 °C para as análises de fenólicos totais, flavonoides e demais análises antioxidantes (SERAFINI et al., 2012).

4.2.3 Preparo dos extratos para aplicação no produto

Para a aplicação no produto, os extratos das ervas aromáticas e do pólen apícola foram submetidos ao processo de rotaevaporação em evaporador rotativo (Fisatom® 802) com temperatura da água do banho a 45 °C, com o objetivo de eliminar o solvente contido nos mesmos.

As partes remanescentes foram congeladas e liofilizadas por 48 horas, em seguida armazenadas ao abrigo da luz e mantidas em freezer até o momento a serem empregadas.

A quantidade de extrato aplicado no produto deu-se conforme os estudos realizados por Serafini (2013), Brum (2009) e Pereira e Pinheiro (2012).

4.2.4 Determinação de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer, Lamuela (1999).

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais construiu-se uma curva analítica utilizando como padrão de referência o ácido gálico nas concentrações de 10, 20, 40, 70, 85 e 100 ppm. Uma alíquota de 500 μ L das diluições do padrão foram adicionadas a 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu em solução aquosa 1:10 (v/v), o qual permaneceu em repouso durante 5 minutos, na sequência adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio 4% (v/v). Repousado por duas horas à ausência de luz, realizou-se a leitura da absorbância da curva em espectrofotômetro a 740 nm. O branco foi conduzido com 500 μ L de água destilada juntamente com 2,5 mL reagente Folin-Ciocalteu e 2 mL de carbonato de sódio.

As análises com os extratos foram regidas nas mesmas condições da curva padrão, substituindo o ácido gálico pelas diluições dos extratos, sendo elas, alecrim 1:100 (1,33 mg/mL), sálvia 1:100 (1,33 mg/mL), manjerição 1:50 (2,66 mg/mL), pólen 1:50 (2,0 mg/mL).

A curva analítica e as análises com os extratos foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em EAG/g de amostra (equivalente em ácido gálico).

4.2.5 Determinação de flavonoides totais

A análise de flavonoides totais foi realizada pelo método descrito por Park et al. (1995).

Uma curva analítica utilizando 10, 20, 30, 40, 50 e 60 μ g quercetina como padrão foi construída, em triplicata, a partir da adição de alíquotas de 500 μ L das diluições do padrão à 4,3 mL de etanol 80%, 0,1 mL de cloreto de alumínio 10% (m/v) e 0,1 mL de acetato de potássio 10% (m/v). Após permanecer em repouso durante 40 minutos à ausência de luz, as absorbâncias da curva foram lidas em espectrofotômetro a 415 nm. Tubos em branco foram conduzidos nas mesmas condições, porém sem adição de cloreto de alumínio.

As análises com os extratos foram realizadas da mesma forma que a curva padrão, substituindo a quercetina pelas diluições dos extratos, sendo essas, alecrim, sálvia e manjerição 1:50 (2,66 mg/mL) e pólen 1:10 (10 mg/mL).

Os resultados foram expressos em mg quercetina/g de amostra.

4.2.6 Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH^{*} (2,2 difenil-1-picridrazina)

4.2.6.1 Atividade antioxidante pelo método do coeficiente de inibição EC₅₀ e porcentagem de atividade antioxidante

A atividade antioxidante pelo método sequestro do radical DPPH foi realizada pela metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995).

Em triplicata, uma alíquota de 500 µL das diluições dos extratos¹ foram adicionados 3 mL de etanol 80% e 300 µL da solução de DPPH (0,5mM). Um controle negativo foi feito substituindo-se o volume do extrato pelo volume do solvente utilizado, ou seja, 3,5 mL de etanol 80% e 0,3 mL da solução de DPPH (0,5mM). Mediu-se a redução do radical DPPH por meio de um monitoramento contínuo do declínio da absorbância, em espectrofotômetro à 517 nm, em tempo inicial e à cada 20 minutos até valores estáveis de absorção.

Construiu-se uma curva cinética para determinar o tempo necessário que a reação leva para atingir estabilidade. Os resultados obtidos foram expressos de duas maneiras, através do coeficiente de inibição (EC₅₀), ou seja, a concentração mínima necessária para os extratos reduzirem em 50% o DPPH inicial da reação (KULISIC, DRAGOVIC-UZELAC; MILOS, 2006), e por porcentagem de inibição (AA%).

¹ Diluições utilizadas: Para alecrim e sálvia: 666,7 µg/mL, 444,4 µg/mL, 333,3 µg/mL, 266,7 µg/mL, 222,2 µg/mL. Para manjerição: 1,330 mg/mL, 0,860 mg/mL, 0,660 mg/mL, 0,530 mg/mL, 0,444 mg/mL. Para pólen: 2,000 mg/mL, 1,000 mg/mL, 0,660 mg/mL, 0,500 mg/mL, 0,400 mg/mL.

Os valores para IC₅₀ serão determinados por regressão linear de gráficos onde o eixo das abscissas (X) representa a concentração em µg/mL e o eixo das ordenadas (Y) a % média da atividade antioxidante das triplicatas segundo a Equação 1 de Mensor et al. (2001).

$$\%AA=100 - \{[(Abs_a - Abs_b) \times 100]/Abs_c\} \quad (Eq.1)$$

Onde Abs_a corresponde à absorbância da amostra, Abs_b à absorbância do branco e Abs_c à absorbância do controle negativo.

4.2.6.2 Atividade antioxidante expressa em referencia ao Trolox

A atividade antioxidante expressa em referencia ao Trolox baseia-se no mesmo principio do método do coeficiente de inibição EC₅₀ e/ou porcentagem de inibição, diferenciando-se apenas, que neste método emprega-se uma curva padrão de Trolox, um composto sintético hidrossolúvel estruturalmente e similar à Vitamina E, que é lipossolúvel.

Alíquotas de 500 µL das diluições dos extratos, sendo elas, alecrim 1:600 (0,22 mg/mL), sálvia 1:400 (0,33 mg/mL), manjericão 1:200 (0,66 mg/mL) e polén 1:300 (0,33 mg/mL), foram adicionadas á 3 mL de etanol P.A e à 300 µL da solução de DPPH (0,5mM). O controle negativo foi conduzido nas mesmas condições, porém sem adição do DPPH e com um volume de 3,3 mL de etanol P.A.

Em seguida, realizaram-se as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro a 517 nm no tempo zero e após 30 minutos de reação, sendo as amostras mantidas a ausência de luz.

Construiu-se a curva padrão de Trolox nas seguintes concentrações 0,0075, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,0625 µmol de trolox, o procedimento para análise seguiu o mesmo citado para as amostras, substituindo as diluições dos extratos pelas do trolox.

Aos resultados referentes às amostras foram expressos em µmol de trolox/ g de amostra.

4.2.7 Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

A medida da atividade antioxidante pelo sistema de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico foi realizada de acordo com o método de Emmons, Peterson e Paul (1999) e Ahn et al. (2004).

Para a emulsão, dissolveu-se 10 mg de β -caroteno em 100 mL de clorofórmio, uma alíquota de 3 mL desta foi adicionada a 40mg de ácido linoleico e 400 mg de tween. A remoção do clorofórmio da emulsão deu-se através de corrente de gás nitrogênio, e o resíduo obtido foi dissolvido em 100 mL de água areada.

Alíquotas de 300 μ L dos extratos, nas seguintes concentrações, alecrim, sálvia e manjerição 1:20 (6,66 mg/mL) e pólen 1:10 (10 mg/mL), foram adicionadas a 3 mL da emulsão ácido linoleico/ β -caroteno e incubadas em banho-maria à 50 °C.

Monitorou-se a oxidação em espectrofotômetro a 470 nm no tempo inicial e em intervalos de 20 minutos até atingir a estabilização final da solução há 120 minutos. Como controle, utilizou-se 300 μ L de etanol 80% juntamente com 3 mL da emulsão.

Um controle foi conduzido com 300 μ L de etanol 80% juntamente com 3 mL da emulsão.

A taxa de atividade antioxidante (AA%) foi expressa como percentual de inibição relativa comparada ao controle após 100 minutos de reação, utilizando a Equação 2.

$$AA(\%) = (DR_C - DR_S)/DR_C \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que: DR_C = taxa de degradação do controle (= $\ln(a/b)/100$); DR_S = taxa de degradação da amostra contendo a substância teste (= $\ln(a/b)/100$); “a” e “b” representam as absorbâncias no tempo inicial (0 min) e no tempo final (100 min), respectivamente.

4.2.8 Atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+}

A análise foi realizada conforme metodologia descrita por Re et al. (1999) e Rufino et al. (2007).

O radical ABTS^{•+} foi formado pela reação de 5 mL de ABTS (7mM) com 8,8 µL de persulfato de potássio (140mM), onde permaneceram à temperatura ambiente durante 16 horas à ausência de luz.

Após o período de incubação, o radical formado foi diluído em etanol P.A. até apresentar uma absorvância de 0,700 à 734 nm. Em ambiente escuro, realizaram-se as análises em triplicata, adicionando-se 30 µL dos extratos, sendo alecrim, sálvia e manjerição 1:20 (6,66 mg/ mL) e pólen 1:20 (5,0 mg/mL), com 3 mL do radical formado.

A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro à 734 nm após 6 minutos de reação, utilizando álcool P.A como branco. Como referência utilizou-se Trolox, um antioxidante sintético equivalente à vitamina E, nas concentrações de 0,045 à 0,0015 µmol para a curva padrão.

Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em µmol TEAC/g de amostra (TEAC – capacidade antioxidante equivalente ao Trolox).

4.2.9 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro – FRAP

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP - *Ferric Reducing Antioxidant Power*), seguiu-se a metodologia descrita por Rufino et al. (2006) e Kukic et al. (2008).

O reagente FRAP foi preparado no momento da análise através da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mM em pH 3,6), 2,5mL de solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5 mL de FeCl₃ (20 mM) em solução aquosa. Uma alíquota de 100 µL dos extratos, sendo alecrim, sálvia e manjerição 1:100 (1,33 mg/mL) e pólen 1:50 (2,0 mg/mL), foi adicionada a 3 mL do reagente FRAP e mantida em banho-maria à 37 °C durante 30 minutos.

Após este período, foram realizadas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro a 593 nm sendo o aparelho zerado com a solução FRAP.

Construiu-se uma curva padrão com sulfato ferroso (100-2000 μM), e os resultados serão expressos em $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ amostra.

4.2.10 Elaboração do produto

O patê de frango foi desenvolvido na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Pato Branco, e conduzido segundo a formulação e procedimentos propostos por Schossler (2009) e Almeida (2004) com algumas modificações.

O produto foi elaborado a partir de uma massa cárnea controle, onde os ingredientes e proporções utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Formulação da massa controle para Patê de Frango

Matéria prima	Quantidade de matéria prima (%)
Corte da coxa e sobrecoxa	32,82
Cortes do peito	7,87
Gordura de frango	24,58
Água	27,38
Sal refinado	1,30
Mix de condimentos ¹	0,37
Proteína isolada de soja	0,60
Fécula de mandioca	4,0
Tripolifosfato	0,50
Nitrato de Sódio (INS 251)	0,30
Eritorbato de Sódio	0,00
Corante carmim	0,073

Fonte: ALMEIDA (2004)

Notas: ¹Alho, cebola, cebolinha, salsa e pimenta desidratados.

O preparo da massa cárnea controle ocorreu conforme o fluxograma da figura 16.



Figura 16 - Esquema geral para preparo de patê de frango

Fonte: ALMEIDA (2004), SCHOSSLER (2009) modificado pelo autor.

Os cortes da coxa, sobrecoxa, peito e a gordura foram divididos em 30% de massa crua e 70% de massa cozida.

Na temperatura de aproximadamente $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$, moeu-se em moedor elétrico com disco de 5 mm os 30% de massa crua. Enquanto, a porção de 70% foi cozida lentamente à temperatura de aproximadamente $60\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, a fim de promover o amaciamento do tecido conjuntivo.

Posteriormente aos processos acima, emulsionou-se em *cutter*, as massas cruas e moídas juntamente com as cozidas, a fim de promover o rompimento dos tecidos das células e a melhor distribuição da gordura. Em seguida, adicionou-se a proteína de soja, hidratada em água mineral gelada, provocando assim a modificação estrutural nas proteínas auxiliando na formação da massa. Os demais ingredientes foram acrescentados após este processo.

Assim, dividiu-se a massa em 6 tratamentos: o tratamento 1 (T1 - sem adição de eritorbato de sódio e extratos naturais), o tratamento 2 (T2 - adição do eritorbato de sódio - 0,2%), tratamento 3 (T3 - adição de 0,2% de extrato de

alecrim), tratamento 4 (T4 - adição de 0,2% do extrato de sálvia), tratamento 5 (T5 - adição de 0,2% do extrato de manjerição) e o tratamento 6 (T6 - adição de 0,2% do extrato de pólen apícola).

Após adição dos respectivos antioxidantes, 50 g dos tratamentos foram acondicionados em potes de vidro, previamente esterilizados e submetidos ao processo de cocção em banho-maria sob controle de temperatura. Este controle se deu através da manutenção de termômetros inseridos dois potes abertos dispostos em diferentes pontos do banho-maria, até que o banho atinge-se a temperatura de 80 °C, assim os produtos foram mantidos durante 30 minutos para que seu interior alcance a temperatura de 72 °C.

Encerrada a etapa de cozimento, os pote de vidros contendo os tratamentos foram resfriados com água e gelo, sendo em seguida armazenados sob refrigeração durante 28 dias.

4.2.11 Índice de peróxido

A análise de índice de peróxido foi realizada segundo a Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho de 1999 (BRASIL, 1999).

Em duplicata, porções de 30 g de cada tratamento foram, individualmente, fragmentadas durante 3 minutos em dispersor ultraturax com 250 mL de clorofórmio P.A., em seguida, filtradas em papel filtro. O filtrado obtido foi refiltrado em papel filtro contendo sulfato de sódio anidro, sendo utilizados 100 mL de clorofórmio para a lavagem do recipiente.

Em erlenmeyers alíquotas de 25 mL do filtrado foram adicionadas a 37 mL de ácido acético P.A. e 1 mL de solução saturada de iodeto de potássio, sendo ocasionalmente agitada durante 1 minuto em ausência de luz.

Em seguida, 30 mL de água foram adicionados, e realizou-se a titulação com tiosulfato de sódio (0,01 mol/L) utilizando-se a solução de amido (1%) como indicador.

Uma prova em branco foi preparada nas mesmas condições, excluindo-se a amostra.

A análise foi realizada no dia do processamento em 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, e o resultado foi calculado a partir da Equação 3 e expresso em miliequivalente por kg de amostra (mEq/kg).

$$IP = (A-B).N.1000/P \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde: A, B, N e P equivalem à mL de solução de tiosulfato de sódio 0,01 mol/L gasto na titulação da amostra, mL de solução de tiosulfato de sódio 0,01 mol/L gasto na titulação do branco, normalidade real da solução de tiosulfato de sódio e peso da amostra (em gramas), respectivamente.

4.2.12 Teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) resultantes da oxidação lipídica das amostras de patê frango foram determinadas pelo método de extração em ácido tricloroacético (TCA), segundo a metodologia proposta por Vyncke (1970).

Para a obtenção da reta que foi empregada na análise, construiu-se uma curva padrão utilizando o tetrametoxipropano.

Um extrato aquoso ácido foi preparado a partir de 5 gramas de cada tratamento, homogeneizadas em dispersor Extratur com 25 mL de ácido tricloroacético 7,5% (TCA) em solução com galato de propila e EDTA.

Após o processo de homogeneização, o extrato foi filtrado e alíquotas deste foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1 mL de TCA (7,5%) e 5 mL TBA (0,02 mol/L), os quais foram agitados e mantidos sob aquecimento à 95 °C durante 40 minutos.

A reação do TBA com a amostra oxidada forma um complexo vermelho que pode ser identificado espectrofotometricamente no comprimento de onda de 538 nm.

Os resultados foram expressos em “valor de TBARS”, definido como mg de malonaldeído por Kg de amostra. Esta análise foi realizada no dia do processamento e em 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES TOTAIS

Realizar a caracterização química de uma amostra através dos métodos de quantificação de fenólicos totais e flavonoides totais traz a perspectiva do quão promissor são as propriedades bioativas da amostra, uma vez que estas estão relacionadas com a atividade antioxidante. O conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonoides presentes no extrato de alecrim, sálvia, manjeriço e pólen estão disponíveis na tabela 2.

Tabela 2 - Teor de compostos fenólicos totais e flavonóides nos extratos de alecrim, sálvia, manjeriço e pólen.

Amostras	Compostos Fenólicos (mg EAG*/ g de amostra)**	Flavonoides (mg quercetina/ g de amostra)**
Alecrim***	46,480 ^a ± 0,08	11,893 ^b ± 0,58
Sálvia***	41,613 ^b ± 0,91	15,033 ^a ± 0,44
Manjeriço [#]	12,797 ^d ± 0,005	2,173 ^d ± 0,22
Pólen ^{##}	18,733 ^c ± 0,17	5,807 ^c ± 0,59

* EAG: Equivalente em ácido gálico **Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão. Médias seguidas de letra diferente na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05). *** 1,33 mg/mL [#]2,66 mg/mL ^{##}2,0 mg/mL

Verifica-se, que tanto para o teor de compostos fenólicos totais quando para o de flavonoides totais, houve diferença significativa (p<0,05) entre as amostras, sendo que o extrato de alecrim apresentou o maior teor de compostos fenólicos (46,480 mg EAG/ g de planta), entretanto o extrato de sálvia apresentou superioridade no teor de flavonóides (15,033 mg de quercetina/ g de planta).

Em comparação a demais estudos, o teor de compostos fenólicos e flavonóides para EEA reportados neste trabalho são superiores aos de Silva (2012), que estudou o extrato aquoso de alecrim oriundo da cidade de São Paulo, obtendo

11,12±0,46 mg EAG/g de amostra, aos de Santos et al (2007) que analisou o extrato hidroalcoólico de alecrim (75%) provenientes de Londrina – Paraná e obteve 6,9 mg EAG/ g de planta², aos de Kim et al (2011) determinou 0,269 mg de quercetina/ g de planta no extrato aquoso de alecrim originário da Coreia.

Para a sálvia, os valores encontrados neste estudo também se apresentam superiores os de Shimano (2012), que determinou 13,83 mg EAG/ g de planta no extrato hidroalcoólico (85%) de sálvia da região de Piracicaba – São Paulo; aos de Roby et al (2012), 5,80± 1,0 mg EAG/ g de planta para o extrato alcoólico de sálvia oriunda da Shambolia.

Entretanto para esta planta, o teor de flavonoides foi inferior ao de Babili et al (2013) que determinou 195,490 mg de quercetina/ g de planta para o extrato aquoso de sálvia de regiões da França.

Resultados similares para o extrato de manjeriço foram verificados nos trabalhos de Nguyen et al (2010) e Tupe et al (2012) ,que quantificou 11,58 ± 3,34 mg GAE/g para o extrato metanólico de manjeriço e 15,33 ± 1,82 mg EAG/g de planta para o extrato metanólico de manjeriço indiano, respectivamente.

De modo geral a quantidade de fenólicos totais e flavonoides totais diferem significativamente para cada planta, independentemente se pertencem à mesma família, pois fatores ambientais, de cultivo e de extração desses compostos influenciam diretamente a quantidade dos mesmos.

Segundo Degáspari et al (2004) a distribuição dos fenólicos e flavonóides nos vegetais dependem de diversos outros fatores de acordo com a fila/ordem/família do vegetal, bem como da variação das espécies. Os padrões de distribuição dependem do grau de acesso à luminosidade, especialmente raios ultravioletas B, pois a formação dos flavonóides é acelerada pela luz.

Os compostos fenólicos e flavonóides totais verificados neste estudo para o pólen, encontram-se similares aos de Liberato et al. (2009) , os quais analisaram extratos etanólicos (70%) de pólen apícola provenientes da região de Trairi- CE e determinaram 19,52 mg EAG/g de amostra e 8,258 mg EQ/ g amostra, e superiores aos de Neves et al. (2009) , os quais também analisaram extratos etanólicos 70% (v/v) de pólen apícola oriundos de Maceió- AL, sendo 13,78 mg EAG/g de pólen e 4,68 mg EQ/ g de pólen.

² Valores convertidos a partir do valor real de 0,46 mg EAG/ mL

Porém os resultados reportados neste estudo foram inferiores aos de Prelipcean (2012), que quantificou o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em extratos metanólicos de pólen, sendo eles 27,64 mg EAG/g de pólen e 8,57 mg EQ/g de pólen, respectivamente.

As quantidades variadas dos compostos fenólicos e flavonoides no pólen são consequências das diferentes floradas que cada abelheiro está exposto, condições climáticas também favorecem essas variações.

5.2 ATVIDADE ANTIOXIDANTE MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH• (2,2 DIFENIL-1-PICRIDRAZINA)

5.2.1 Coeficiente de inibição EC₅₀ e porcentagem de atividade antioxidante

O método do sequestro do radical DPPH tem sido frequentemente empregado para se avaliar a capacidade sequestrante de radicais livres em produtos naturais. Como a medida da atividade antioxidante por este método se baseia da redução de uma espécie radical em presença de um antioxidante, faz-se prudente realizar a evolução cinética deste, já que existem substâncias antioxidantes que reagem de formas distintas.

Segundo Brand-Willians, Cuviler e Berset (1995) compostos com atividade antioxidante, em geral, podem apresentar três modelos de comportamento cinético: a cinética rápida é caracterizada por substâncias que reagem rapidamente com o DPPH (cerca de 1 minuto); a cinética intermediária ocorre em até 30 minutos e a cinética lenta demoram mais de uma hora para completar a reação.

Devido à existência desses diferentes modelos cinéticos, os extratos foram avaliados em diferentes concentrações para que pudesse ser definido o tempo em que os substratos levam para atingir a estabilidade em presença do radical.

As figuras 17,18,19 e 20 demonstram o perfil cinético para cada extrato.

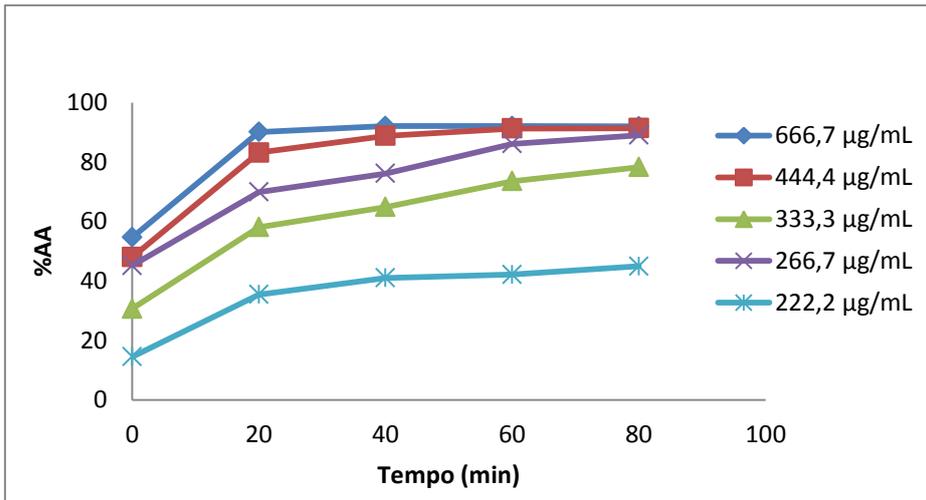


Figura 17- Cinética do potencial antioxidante do EEA pelo método de DPPH.
 Fonte: Do autor (2014)

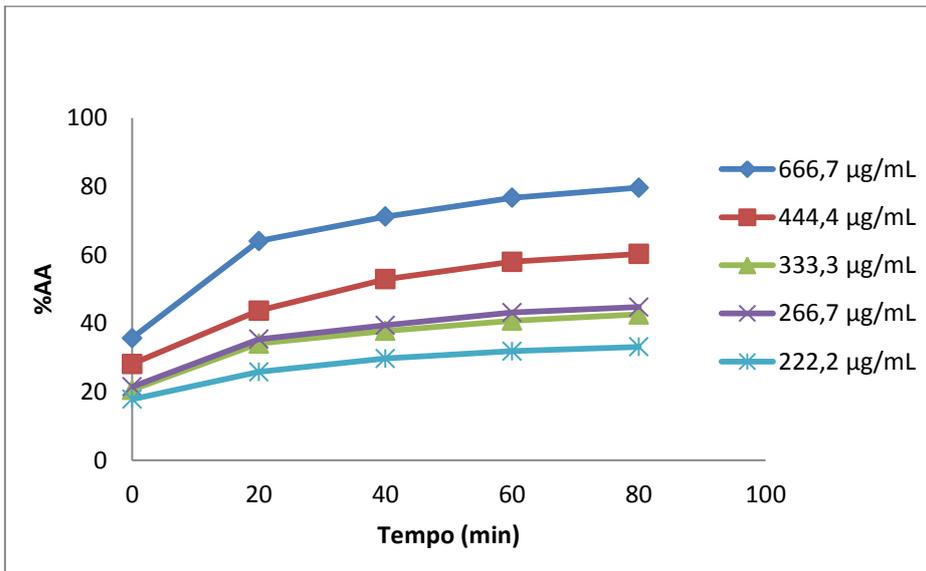


Figura 18 - Cinética do potencial antioxidante do EES pelo método de DPPH.
 Fonte: Do autor (2014)

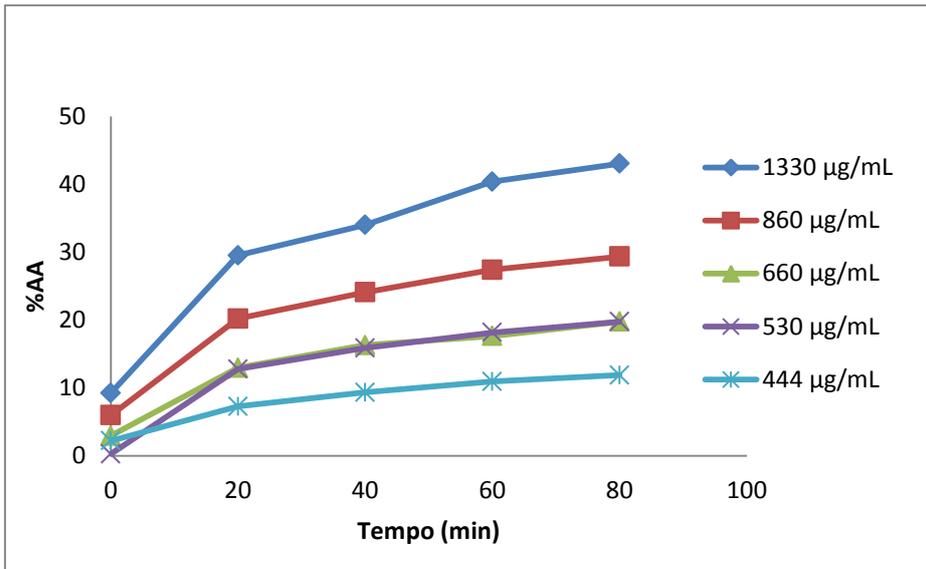


Figura 19- Cinética do potencial antioxidante do EEM pelo método de DPPH.
 Fonte: Do autor (2014)

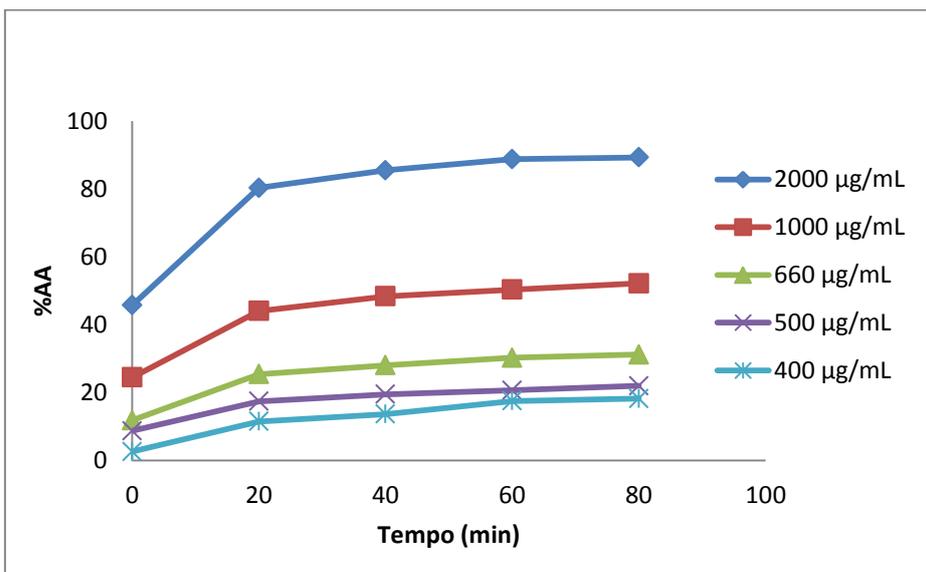


Figura 20- Cinética do potencial antioxidante do EEP pelo método de DPPH.
 Fonte: Do autor (2014)

Nota-se através dos gráficos que cada extrato possui um comportamento diferente de acordo com a concentração testada, entretanto, o consumo do radical pelos compostos com atividade antioxidante presentes nos extratos tornaram a reação estável entre 40 e 60 minutos, caracterizando assim os comportamentos cinéticos dos extratos como intermediário e lento.

Portanto, como a presença de compostos de ação intermediária é um indício que o objeto em análise apresenta-se como um bom antioxidante, devido ao fato que os radicais livres são moléculas muito instáveis, possuindo meia vida muito curta e quanto mais rápida a ação do antioxidante na neutralização do radical livre, melhor será seu efeito tanto em alimentos como no organismo animal, os extratos testados neste trabalho apresentam-se como uma fonte promissora de antioxidantes (OLIVEIRA, 2011).

Além da cinética, umas das melhores maneiras de interpretação dos resultados encontrados por este método são pelo meio do EC_{50} , ou seja, a concentração de substrato que reduz em 50% o radical DPPH inicial da reação e através da porcentagem de atividade antioxidante do substrato.

Ressalta-se que a atividade antioxidante em termos de porcentagem de redução foi determinada no tempo de 80 min, onde a cinética já se encontra estabilizada.

Na tabela 3 estão dispostos os resultados encontrados para os extratos das ervas, do pólen em comparação aos antioxidantes comerciais.

Tabela 3 - Atividade de sequestro do radical DPPH: EC_{50} e porcentagem de atividade antioxidante

Amostras	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) *	% AA*
Alecrim	254,72 ^d \pm 0,66	92,25 ^a \pm 0,46
Sálvia	398,86 ^c \pm 0,10	79,81 ^d \pm 0,56
Manjericão	1376,24 ^a \pm 0,50	43,43 ^g \pm 0,34
Pólen	1087,57 ^b \pm 0,36	89,48 ^c \pm 0,22
BHT	114,67 ^e \pm 0,15	53,37 ^f \pm 0,11
BHA	72,246 ^f \pm 0,18	73,69 ^e \pm 0,13
α -tocoferol	61,22 ^g \pm 0,17	90,53 ^b \pm 0,06
Eritorbato de sódio	49,03 ^h \pm 0,06	-

*Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão. Médias seguidas de letra diferente na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Em relação aos resultados expressos pelo EC_{50} nota-se que para todas as amostras, tanto os extratos como os antioxidantes comerciais apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) entre si.

Entre os extratos, o de alecrim apresentou o menor valor de EC_{50} e conseqüentemente o maior valor em porcentagem de redução do radical, enquanto entre os antioxidantes comerciais, o eritorbato de sódio apresentou menor valor de EC_{50} .

Estudos realizados por Santos (2007), que obteve para o extrato hidroalcoólico de alecrim (75%) 90,14% de inibição do radical encontram-se similares aos deste trabalho, porém resultados foram inferiores aos de Rocha et al (2013), que determinou que 125,0 $\mu\text{g/mL}$ do extrato etanólico de alecrim (95%) são necessários para inibir 50% do radical DPPH.

Para sálvia, Roby et al (2012) e Farhat et al (2013), encontraram $0,0019 \pm 0,0003\%$ de inibição do radical DPPH para o extrato de etanólico e valor de EC_{50} de $7,32 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ para o extrato de metanólico, respectivamente, logo o EES investigado neste projeto demonstra resultados superiores de inibição do radical porém sendo necessário uma concentração superior para reduzir o 50% do radical.

No caso do manjeriço, os resultados deste trabalho foram inferiores aos de Albayrak et al (2013) que determinou o EC_{50} de 41,80 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato metanólicos de manjeriço e aos resultados de Gobetti (2012) que estudou extrato hidroalcoólico de manjeriço da cidade de Pato Branco- Paraná e obteve $88,74 \pm 0,36\%$ de inibição.

Os resultados da atividade antioxidante do EEP apresentados neste estudo mostraram-se superiores aos encontrados por Moraes et al. (2011) que analisaram oito amostras diferentes de pólen apícola de cinco parques nacionais em Portugal, onde determinaram valores de EC_{50} que variaram entre 2160,0 e 5870,0 $\mu\text{g/mL}$. Valores superiores também foram encontrados em comparação os estudos de Nogueira (2012) que verificou as propriedades bioativas de oito amostras de pólen comercial da região de Bragança- PA, determinando que os valores de EC_{50} que variaram entre 2745,0 e 545 $\mu\text{g/mL}$, enquanto as porcentagens de inibição variaram entre 45,99% e 54,12%.

5.2.2 Atividade antioxidante expressa em referencia ao Trolox

A quantificação da atividade antioxidante através do padrão de trolox possibilita determinar o quão promissor são os substratos em análise, uma vez que este composto desempenha as mesmas funções antioxidantes que a vitamina E, porém apresenta a vantagem de ser hidrossolúvel (DAVIS et al, 1988.; SILVA et al, 2009).

Na tabela 4 encontram-se os valores obtidos para a capacidade antioxidante expressa em relação ao trolox sob o mecanismo de oxidação do DPPH.

Tabela 4 - Atividade de sequestro do radical DPPH quantificação através do trolox

Amostras	$\mu\text{mol trolox/g de amostra}^*$
Alecrim**	$4745,72^c \pm 0,47$
Sálvia***	$2462,82^e \pm 0,03$
Manjeriçã****	$1575,24^f \pm 0,03$
Pólen***	$1042,29^g \pm 0,08$
BHT#	$4277,33^d \pm 73,53$
BHA #	$4716,37^c \pm 66,37$
α -tocoferol #	$5270,03^b \pm 97,27$
Eritorbato de sódio #	$7087,18^a \pm 171,467$

*Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão. Médias seguidas de letra diferente na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). **0,22 mg/mL *** 0,33 mg/mL **** 0,66 mg/mL # 0,1 mg/mL

Nota-se a partir da tabela acima que somente o extrato de alecrim e o BHA não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$).

Para esta análise o eritorbato mostrou melhores resultados, seguido do α -tocoferol, do BHA e do extrato de alecrim, enquanto o extrato de pólen apresentou o menor resultado.

Estudos realizados por Ravelli (2012), que determinou 1,46 $\mu\text{mol trolox/g}$ planta para o extrato hidroalcoólico de alecrim, encontram-se inferiores ao encontrado neste trabalho.

O extrato de sálvia avaliado neste trabalho apresentou valores superiores aos Salem et al (2013) e Neagu et al (2010) que estudando o extrato de sálvia (acetona-água) que determinaram 0,212 $\mu\text{mol trolox/g}$ e 59,49 $\mu\text{mol trolox/g}$ para o extrato hidroalcolico (50% v/v), respectivamente.

Valores superiores também foram encontrados aos de Nguyen et al (2010) que determinaram $40,5 \pm 0,18 \mu\text{mol trolox/g}$ para o extrato hidroalcolico.

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO SISTEMA B-CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO

No sistema de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico a atividade antioxidante de uma amostra é determinada com base ação inibidora que os compostos bioativos dessa amostra têm sob os radicais livres que são gerados pelo ácido linoléico (CARPES et al, 2008).

A tabela 5 mostra os resultados da atividade antioxidante dos extratos analisados e para dos antioxidantes comerciais, BHA,BHT, α -tocoferol e eritorbato de sódio.

Tabela 5- Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

Amostras	Atividade antioxidante (%)*
Alecrim**	$85,67^b \pm 0,66$
Sálvia**	$89,29^a \pm 0,10$
Manjeriçã**	$44,70^g \pm 0,50$
Pólen***	$71,45^d \pm 0,36$
BHT****	$63,68^f \pm 0,15$
BHA****	$68,05^e \pm 0,18$
α -tocoferol****	$70,29^{de} \pm 0,17$
Eritorbato de sódio****	$77,27^c \pm 0,06$

*Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão. Médias seguidas de letra diferente na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ** 6,66 mg/mL ***10 mg/mL **** 0,1 mg/mL

Através da análise estatística nota-se o extrato de pólen e o α - tocoferol não diferiram estatisticamente, este mesmo comportamento é observado entre o α - tocoferol e o BHA.

Entre os antioxidantes comerciais o que apresentou maior eficiência em percentual de inibição da oxidação foi eritorbato de sódio, entretanto verifica-se que os extratos de alecrim e o de sálvia mostraram maior percentual de inibição que esse substrato. Porém, deve-se considerar que a concentração utilizada nesta análise, para os antioxidantes comerciais, é inferior a utilizada pelos extratos, desta forma o percentual de inibição realmente é maior nos antioxidantes comerciais, pois eles se apresentam de forma pura.

Athamena et al (2012) estudando o extrato metanólico de alecrim (7:30 v/v) determinaram 45,41% de inibição para o sistema β -caroteno/ácido linoléico em 2 mg/mL, logo o resultado encontrado no presente trabalho apesar de apresentar uma inibição de aproximadamente 2 vezes mais que a de Athamena (2012), é necessário uma concentração maior para que isto aconteça.

O extrato de sálvia e de manjerição apresentaram-se inferiores aos de Shio et al (2012) que estudaram os extratos metanólicos dessas ervas provenientes da região de Juiz de Fora- Minas Gerais, e determinaram $61,66 \pm 2,80$ % de inibição para a sálvia e $32,76 \pm 11,20$ para o manjerição nas concentrações de 0,04 mg/ mL.

O extrato etanólico de pólen apresentou menor inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico quando comparado aos estudos de Karling et al. (2012) que avaliaram atividade antioxidante do extrato de pólen apícola obtendo uma inibição de 89,71% (10 mg/mL).

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS**

O método de captura do radical ABTS oferece resultados bastante reprodutíveis, pois permite analisar compostos de natureza lipofílica e hidrofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

A tabela 6 traz os resultados referentes à atividade antioxidante dos extratos em comparação aos antioxidantes comerciais.

Tabela 6- Atividade antioxidante equivalente ao Trolox pelo método ABTS⁺⁺

Amostras	Atividade antioxidante ($\mu\text{mol TEAC/g}$)*
Alecrim ^{**}	301,47 ^d \pm 0,759
Sálvia ^{**}	182,89 ^d \pm 0,526
Manjeriçã ^{**}	71,62 ^d \pm 0,804
Pólen ^{***}	91,75 ^d \pm 0,405
BHT ^{****}	4277,33 ^c \pm 73,533
BHA ^{****}	4743,04 ^b \pm 66,37
α -tocoferol ^{****}	5270,03 ^a \pm 97,275
Eritorbato de sódio ^{****}	5026,41 ^a \pm 158,23

*Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão. Médias seguidas de letra diferente na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). **6,66 mg/ mL ***5,0 mg/mL ****0,1 mg/mL

Na Tabela 6, pode-se visualizar que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre a atividade antioxidante dos extratos e dos antioxidantes comerciais.

Apesar de não apresentar diferença estatística significativa ($p > 0,05$), dentre os extratos, o de alecrim, foi o que apresentou melhor resultado, seguido do extrato de sálvia, pólen e manjeriçã. Este mesmo extrato mostrou superioridade também ao trabalho de Pereira, Carpes (2012) que determinaram $190,96 \pm 13,35 \mu\text{mol TEAC/g}$ planta.

Resultados superiores para o EES e para o EEP foram encontrados aos trabalhos de Salen et al (2013) e Perez et al (2012), que determinaram $0,0403 \mu\text{mol TEAC/g}$ de sálvia e $0,0184 \mu\text{mol TEAC/g}$ de pólen, respectivamente.

Em comparação aos antioxidantes comerciais, os extratos apresentaram atividade antioxidante inferior, entretanto como se trata de substâncias puras, estas apresentam elevada capacidade de sequestro de radicais livres.

Entre aos antioxidantes comerciais eritorbato de sódio e o α - tocoferol não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO – FRAP

As amostras também foram avaliadas pelo método de redução do ferro-FRAP, no qual é testada a capacidade que um substrato tem em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} , uma vez que o Fe^{3+} age como catalisador de reações de oxidação.

Tabela 7- Atividade antioxidante pela redução do ferro (FRAP)

Amostras	$\mu\text{mol de Fe}^{2+}/\text{g de amostra}$
Alecrim	180,090 ^a \pm 0,01
Sálvia	133,993 ^b \pm 0,681
Manjeriçã	55,467 ^g \pm 0,851
Pólen	30,4733 ^h \pm 0,454
BHT	63,680 ^f \pm 0,18
BHA	68,060 ^e \pm 0,22
α -tocoferol	70,290 ^d \pm 0,17
Eritorbato de sódio	73,680 ^c \pm 0,07

*Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão. Médias seguidas de letra diferente na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Através da análise estatística pelo teste de tukey observa-se que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as amostras e que o extrato de alecrim obteve o melhor resultado quando comparado os demais extratos e com os antioxidantes comerciais.

Entre os extratos, o que conseguiu reduzir maior quantidade de Fe^{3+} em Fe^{2+} foi o alecrim, enquanto entre os antioxidantes comerciais o melhor resultado foi do eritorbato de sódio.

5.6 ÍNDICE DE PERÓXIDO

Nesta análise são quantificados os produtos primários da oxidação, ou seja, aqueles que se formam na fase inicial de oxidação, na qual há liberação de peróxidos e conseqüentemente alterações nas propriedades organolépticas do produto.

A análise de índice de peróxido, empregada neste trabalho, foi realizada até os 28 dias de armazenamento do produto, e a quantidade de peróxido estimada foi a mesma para todos os tempos e tratamentos (<0,2 mEq/Kg), resultados similares foram encontrados nos estudos de Golçalves et al (2009) que determinou o IP para a carne mecanicamente separada de frango produzidas no estado de Goiás.

Segundo Nawar (1993) o valor de índice de peróxido cresce até um máximo a partir do qual volta a diminuir, correlacionado a sua presença com o desenvolvimento de aromas e sabores a ranço, entretanto este comportamento não foi observado para o patê frango.

A legislação brasileira estabelece o limite máximo 10 mg de peróxido/kg de amostra, logo os resultados para o patê de frango encontram-se bem abaixo do limite.

5.7 ANÁLISE DE TBARS

O TBARS é um método comumente empregado para medir a extensão da oxidação de uma amostra quando esta se encontra na fase de término, na qual ocorre a formação de compostos secundários, como malonaldeído. Os peróxidos são produtos primários da oxidação, no decorrer da sua decomposição geram compostos de natureza muito diversa, os quais são designados como produtos secundários (SILVA et al., 1999).

Tabela 8 - Valores médios de TBARS nos diferentes tratamentos de patê de frango durante o período de armazenamento

Tratamentos	TBARS (mg malonaldeído/kg amostra)*				
	Dias				
	0	7	14	21	28
EEA	^c 0,9823±0,02 ^D	^c 1,228±0,04 ^C	^b 2,234±0,01 ^A	^a 1,870±0,02 ^B	^f 1,876±0,02 ^B
EES	^{bc} 1,177±0,10 ^D	^a 1,706±0,04 ^C	^a 2,693±0,01 ^A	^a 1,857±0,03 ^C	^d 2,369±0,04 ^B
EEM	^b 1,293±0,06 ^C	^a 1,696±0,09 ^B	^c 1,625±0,04 ^B	^b 1,459±0,06 ^{CD}	^e 2,141±0,02 ^A
EEP	^b 1,248±0,04 ^C	^b 1,489±0,03 ^B	^c 1,632±0,01 ^B	^b 1,549±0,01 ^B	^b 2,972±0,04 ^A
E.S**	^{ab} 1,583±0,04 ^C	^a 1,725±0,05 ^C	^b 2,181±0,01 ^B	^a 1,999±0,03 ^B	^c 2,599±0,04 ^A
Controle	^a 1,706±0,23 ^D	^a 1,868±0,02 ^B	^d 1,250±0,03 ^C	^c 1,063±0,02 ^C	^a 3,758±0,28 ^A

*Valores apresentados como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. ** Eritorbato de sódio

Os resultados apresentados na tabela 8 demonstram que no dia do processamento o tratamento controle e o tratamento com adição de eritobarto de sódio não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) pelo teste de tukey, este mesmo comportamento foi o observado entre o tratamento com extrato de pólen, manjeriço e com eritorbato de sódio.

O tratamento com extrato de alecrim não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) entre o extrato de sálvia, que por sua vez também não apresentou diferença significativa entre os tratamentos que receberam manjeriço e pólen.

Ainda referente ao dia de processamento, as amostras que receberam extrato de alecrim e sálvia apresentaram o menor teor de malonaldeído formado ao, comportamento contrário observado para o tratamento controle.

Nota-se que nos tratamentos com adição de extrato de alecrim, sálvia, pólen e o antioxidante comercial houve o desenvolvimento de malonaldeído até os 14 dias de armazenamento, seguido então de uma queda desta quantidade, a qual foi identificada aos 21 dias. Nos tratamentos com adição de manjeriço e o tratamento controle esta queda foi observada aos 14 dias de armazenamento, indicando que o nível máximo de eventos oxidativos aconteceram primeiro, demonstrando assim que os produtos gerados durante a oxidação do patê são pouco estáveis, entretanto o

eritorbato de sódio e os extratos de alecrim, sálvia e pólen atuaram como agentes redutores de oxidação, retardando a formação do malonaldeído.

Aos 28 dias de armazenamento o controle apresentou a maior oxidação em termos de malonaldeído, enquanto o tratamento com extrato de alecrim, sálvia e manjerição mostram-se mais eficientes à redução da formação de MDA que o eritorbato de sódio, entretanto este apresentou menor quantidade de malonaldeído formado do que os tratamentos com adição de extrato de pólen.

Dentre os extratos nota-se que o de alecrim foi superior aos demais na redução ao nível de degradação da amostra.

Borba et al (2012) e Ramalho e Jorge (2006) também verificaram a eficácia do alecrim como agente redutor de oxidação em produto fresco embutido elaborado com carne mecanicamente separada e em gordura animal, obtendo resultados superiores aos antioxidantes sintéticos como o BHA (butil-hidroxi-anisol) e BHT (butilhidroxitolueno), respectivamente.

Estudos relacionados a outras ervas da família das *Lamiaceae*, como a manjerona demonstram que a aplicação do extrato aquoso desta erva em linguiças frescas de frango proporcionou melhores resultados em relação à estabilidade oxidativa das amostras (KUFNER, 2010).

No Brasil, não existe uma legislação que limite a quantidade de malonaldeído/kg em produtos cárneos, entretanto alguns autores consideram que valores inferiores a 3 mg malonaldeído/Kg de amostra satisfatórios para a qualidade dos produtos (AL-KAHTANI; ABU-TARBOUSH; BAJABER, 1996). Assim, observa-se que os extratos empregados no patê apresentaram resultados satisfatórios durante os 28 dias de armazenando, somente o controle no último dia de armazenamento mostrou resultado superior a 3 mg malonaldeído/Kg de amostra.

6 CONCLUSÃO

Com base nos dados apresentados pode-se concluir que entre os extratos testados o de alecrim e o de sálvia apresentaram os melhores resultados para a maioria das análises.

Na análise de porcentagem de redução do radical DPPH, o extrato de alecrim, mostrou-se mais eficiente que os antioxidantes comerciais, enquanto na análise de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, este mesmo extrato juntamente com o EEP e EES mostraram superioridade aos antioxidantes comerciais, entretanto considera-se a atividade antioxidante dos padrões superior à dos extratos, uma vez que a quantidade utilizada nessas análises são muito baixas e que se tratando de substancias isoladas e puras esses antioxidantes já tem funções definidas.

Através do emprego diversas métodos de avaliação da atividade antioxidante foi possível analisar as amostras em diferentes perspectivas, determinando-se assim que todos os extratos testados apresentam potencial antioxidante, uns mais que os outros, dependendo do método empregado, e que este potencial antioxidante pode estar correlacionado com o teor de compostos fenólicos e flavonoides presentes nestes substratos.

Em relação à oxidação lipídica, a formulação controle do patê foi o que apresentou maior formação de malonaldeídos durante o armazenamento, enquanto os demais tratamentos adicionados com os extratos comportaram-se similarmente ao tratamento com eritorbato. Sendo que o extrato de alecrim, sálvia e manjerição apresentaram maior capacidade de interação antioxidante com o produto e como consequência resultados superiores a proteção a oxidação lipídica do produto.

Com este resultado, em específico, conclui-se que os extratos adicionados funcionam como antioxidantes uma vez que inibem a formação dos compostos primários, diminuindo assim a propagação dos secundários.

Por fim, as amostras testadas apresentam-se como fonte promissora de agentes antioxidantes podendo ser empregadas na indústria de alimentos visando diminuir ou até substituir o uso de antioxidantes sintéticos. Além disso, podem ser utilizadas para elaboração de novos produtos que apresente *flavor* diferenciado, proporcionando um alimento mais saudável e satisfazendo diversos grupos de consumidores.

7 REFERENCIAS

ABIDILLE, M.D.H; SINGH, R.P.; JAYAPRAKASHA, G.K; JENA, B.S, Antioxidant activity of extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, Barking, 2005.

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K.S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant Activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7286-7292, 2004.

ALBAYRAK, Sevil; AKSOY, Ahmet; ALBAYRAK, Songul; SAGDIC, Osman. In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activity of Some Lamiaceae Species. *Iranian Journal of Science & Technology*. 2013.

AL-KAHTANI, H. A.; ABU-TARBOUSH, H. M.; BAJABER, A. S. Chemical changes after irradiation and post-irradiation storage in Tilapia and Spanish mackerel. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 4, p. 729-733, 1996.

ALMEIDA, C.O **Avaliação físico-química e microbiológica de linguiça Toscana porcionada e armazenada em diferentes embalagens, sob condições de estocagem similares às práticas em supermercado**. 2005. 150f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

AMIN, I.; NORAZAIDAH, Y.; HAINIDA, K.I.E. Antioxidant activity and phenolics content of raw and blanched *Amaranthus* species. **Food Chemistry**, Barking, 2006.

ANDERSEN, M. L.; LAURIDSEN, R. K.; SKIBSTED, L. H. Optimizing the use of phenolic compounds. **Phytochemical Functional Foods**. Cambridge, p.315-346, 2003.

ANGELO, PRISCULA M., JORGE, NEUZA. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 2007.

ANTIOXIDANTES NATURAIS: Vegetais, Frutas, Ervas, Especiarias e Chás. Aditivos & Ingredientes. Disponível em: http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/129.pdf

AOCS; Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society, **AOCS: Champaign**, 2004.

APAK, R.; GUÇLU, K.; OZYUREK, M.; KARAMEDIR, S. E. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and a E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, 2004.

ARAÚJO, JÚLIO M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 4. ed. Viçosa: UFV- Universidade Federal de Viçosa, 2008.

ARNAO, M.B. Some methodological problems in determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food & Technology**, London, v.11, n. 11, p.419-421, 2000.

ATHAMENA S.; ATHAMENA M.; LAROUI S.; SEGUENI N. Evaluation of the Antioxydant Activity of the Rosmarinus officinalis Extracts. *Sciences & Technologie*, v. 36, p. 45-50, 2012.

BABILI, Fatiha EL; BABILI, Mohammed E.L.; SOUCHARD, Jean P.; CHATELAIN Christian. Culinary Decoctions: Spectrophotometric Determination of Various Polyphenols Coupled With Their Antioxidant Activities. **Pharmaceutical Crops**, v.4, p. 15-20, 2013.

BAILEY, A. E.; **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. John Wiley: New York 1996, vol. 3, 5th edition.

BENZIE, I.F.F., STRAIN, J .J. Ferric reducing/antioxidnt power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods Enzymol**. V.299, p.15-27, 1999.

BERGAMASHI, KEITYANE B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 2010, 97 f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz. Piracicaba, 2010

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft Und-technologie**, 1995

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instruções para a Autorização de Uso de Produtos. Instrução normativa nº 21, de 31 de julho de 2000. Anexo I: Regulamento técnico de identidade e qualidade de patê. **Diário Oficial da União**, Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa e Agropecuária. Instrução Normativa N° 06, de 15 de fevereiro de 2001. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de empanados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa e Agropecuária. Instrução Normativa N° 51, de 29 de dezembro de 2006. Adotar o Regulamento Técnico de Atribuição de Aditivos, e seus Limites das seguintes Categorias de Alimentos: Carne e Produtos Cárneos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 dezembro de 2006.

BRUM, E. B. **Antioxidante natural de marcela (*Achyrocline satureioides*) e de erva mate (*Ilex paraguariensis*) na elaboração de linguça toscana**. 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BUTYLATED HYDROXYANISOLE. **Report on Carcinogens**. United, States of America: June. 2011. 20th edition.

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

CARPES, S. T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil.** 2008. 255 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), UFPR, Curitiba, 2008.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos.** Editora: Unicamp, Campinas, São Paulo, 1999.

CHENG, Z.; REN, J.; YAN, G.; LI, Y.; CHANG, W.; CHEN, Z. Quantitative elucidation of the molecular mechanisms of hydroxyl radical quenching reactivity of phenolic compounds. **Bioorg. Chemistry**, 2003.

COUTINHO, LUCIANO. G.; FERRAZ, JOÃO. C. Competitividade na Indústria de Abate e Preparação de Carnes - Estudo da Competitividade da Indústria Brasileira. **Nota Técnica Setorial do Complexo Agroindustrial.** Campinas: IE/UNICAMP - IE/ UFRJ, 1993. 63p.

DAVIS PH, Mill RR, Tan K. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh: **Edinburgh University Press**, (Vol. 10, Suppl. 1). 1988

DEGÁSPARI, CLÁUDIA HELENA; WASZCZYNSKYJ, NINA. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Revista Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jan.- Jun./2004.

DEWICK, P.M. The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids. **Medicinal Natural Products; a biosynthetic approach.** 2009.

DOSSIÊ ANTIOXIDANTES. Food Ingredients Brasil:in Revista FI. São Paulo, nº06, 2009.

DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 3, p. 200-227, 2004.

EMMONS, C. L.; PETERSON, D. M.; PAUL, G. L. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts in vitro antioxidant activity and content of phenolic and tocol antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 4894-4898, 1999.

Estatísticas da produção pecuária. **IBGE**, março de 2013: Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201204_publ_completa.pdf> . Acesso em: 30 ago. 2013.

FARHAT, Mouna B.; LANDOUSLI Ahmed; CHAOUCH-HAMADA Rym; SOTOMAYOR Jose A.; JORDÁN María. Characterization and Quantification of Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of *Salvia* Species Growing in Different Habitats. **Industrial Crops and Products**. v.49, p. 904-914; 2013.

FARHAT, Mouna B.; CHAOUCH-HAMADA, Rym; SOTOMAYOR Jose A.; LANDOUSLI, Ahmed; JORDÁN María J. Antioxidant Potential of *Salvia officinalis* L. residue as affected by the harvesting time. **Industrial Crops and Products**. v.54 p. 78-85, 2014.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B. da ; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo, SP: Nobel, 511p, 2008.

GONÇALVES, R. M. et al. Avaliação físico-química e conteúdo de metais pesados em carne mecanicamente separada (CMS) de frango e de bovino produzidas no estado de Goiás. **Ciência. Anim. Bras.** v. 10, n. 2, p. 553-559, abr./jun. 2009.

GORDON, M. H. The mechanism of antioxidant action in vitro; Hudson, B. J. F., ed.; Elsevier Applied Science, Londres, 1990

GRAY, J. I.; PEARSON, A. M. Rancidity and warmed over flavor in **Advances in Meat Research**, AVI Book, New York, v. 3, 1987.

GREAT FOODS BRASIL. Ácido eritóbico e eritorbato de sódio. Disponível em: <http://www.greatfoodsbrasil.com/acidoeritorbico.htm>. Acesso em: 18/02/2014.

HARBORNE, J. B. **Introduction to Ecological Biochemistry**. Londres: Elsevier, 1993.

HUANG, D.; Ou, B.; Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 2005.

KARLING, Mariéli; Carpes S.T. Estudo da melhor condição de extração de compostos com atividade biológica in vitro em extratos etanólicos de pólen apícola. **Seminário de Iniciação Científica XVII Curitiba – PR**, 2012.

KOZICS, KATARÍNA; KLUSOVÁ, VERONIKA; SRANCOKIVÁ ANNAMÁRIA; MUCAJI, PAVOL; HUNÁKOVÁ LUBICA; KUSZNIEREWICZ BARBARA; HORVATHOVÁ, EVA. Effects of *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* on Oxidant-induced DNA Damage and Antioxidant Status in HepG2 cells. **Food Chemistry**. v.141, p. 2198-2206. 2013.

KIRSCHNIK, P. G.; MACEDO-VIEGAS, E. M. Efeito da lavagem e da adição de aditivos sobre a estabilidade de carne mecanicamente separada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante estocagem a -18°C . ; **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29; p. 200-206, 2009.

KUFNER, Danny E. **Atividade antioxidante do extrato aquoso de Manjerona (*Origanum majorana* L.), em linguiça frescal de Frango**. 2010. 56f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, 2010.

KUKIC, J.; POPOVIC, V.; PETROVIC, S.; MUCAJI, P.; CIRIC, A.; STOJKOVIC, D.; SOKOVIC, M. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. **Food Chemistry**, v. 107, 2008.

KULISIC, T.; DRAGOVIC-UZELAC, V.; MILOS, M. Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n.4, p. 485–492, 2006.

KUSKOSKI EM, ASUERO AG, TRONCOSO AM, MANCINI Filho J, FETT R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Cien Tecnol Aliment** 25(4):726-32 2005.

KWEE, Eillen M.; NIEMEYER; Emily D. Variations in Phenolic Composition and Antioxidant Properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) Cultivars. **Food Chemistry**. V 128- p. 1044-1050. 2011.
LEE SJ; UMANO K; SHIBAMOTO T, LEE KG. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, 2005.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo, SP: Atheneu, 2009.

LIBERATO, M. C. T. C.; MORAIS, S. M.; SALUSTIANO, G. L.; NOJOSA, A. C. B.; NOJOSA, A. K. B. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS E FLAVONÓIDES EM AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA DE APIS MELLIFERA L. DO CEARÁ. **49º Congresso Brasileiro de Química**. 2009

MACDONALD-WICKS, L.K.; WOOD, L.G.; GARG, M.L. Methodology for the determination on biological antioxidant capacity in vitro: a review. **Journal of Science of Food and Agriculture**, 2006.

MENSOR, L. L.; et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phototherapy Research**, v.15, p.127–130, 2001.

MILANI, L. I. G. et al. Inibição natural da oxidação lipídica na carne mecanicamente separada de frango. **Congresso brasileiro de ciência e tecnologia dos alimentos**, Porto Alegre, 2002.

MORAIS, Margarida, Moreira. L; Feás, X; Estevinho, L;. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity . **Food and Chemical Toxicology**, 2011.

MORRISEY, P. A.; SHEEHY, K. G.; KERRY, J. P.; BUCKLEY, D. J. Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, v. 49, n. 1, p. 573-586, 1998.

NACZK, M; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, 2004.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. (Ed.). **Food Chemistry**. 2.ed. New York : Marcel Dekker, p.139-244, 1985.

NEAGU, Elena; ROMAN, Gabriela P.; RADU, Gabriel L. Antioxidant Capacity of Some Salvia Officinalis Concentrated Extracts. **Revue Roumaine de Chimie**. v.58, p. 777-782. 2011.

NEVES, L. C; ALENCAR S. M; CARPES, S.T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Journal of Food and Technologic**, 2009.

NGUYEN, Phuong; KWEE, Eileen M.; NIEMEYER Emily D. Potassium rate Alter the Antioxidant Capacity and Phenolic Concentration of Basil (*Ocimum basilicum L.*) leaves. **Food Chemistry**. v. 123 p. 1235-1241. 2010.

NOGUEIRA, Carla M. P. **Estudo do polén apícola comercial**. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar, Bragança- PA, 2012.

NUNES, FÁBÍOLA M. N.; PEREIRA, PEDRO A.P; ANDRADE, JAILSON B. Reações de ozonólise de olefinas em fase gasosa. **Química Nova**, 2000.

OETTERER, MARÍLIA. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri, São Paulo. Editora Manole. 612 p, 2006.

OLIVEIRA, ADOLFO M.C. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e atividade antifúngica de pimentas do gênero *capsicum spp.*** Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição)- Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

ORDÓÑEZ, JAVIER. A. **Tecnologia de alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

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

PADILHA, ANE. D. G. **Antioxidante natural na conservação da carne de frango *in vivo***. 2007. 126f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; SATO, H. H.; CONTADO, J. L. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 1995.

PEREIRA, Daiane; CARPES, Solange T. Avaliação da Atividade Antioxidante, Antimicrobiana do Óleo Essencial e de Extratos de Alecrim (*Rosmarinus OFFICINALIS*). **SICITE, XVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR**. 2012.

PEREIRA, Daiane; PINHEIRO, Rafaelly S. Elaboração de Hamburgueres com Antioxidantes naturais Oriundos de Extratos Etanólicos de Alecrim (*Rosmarinus officinalis. L.*). Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco. 2013

PÉREZ- PÉREZ, Elizabeth M, et al. Antioxidant activity of four colors fraction of bee pollen of Merida, Venezuela. Archivos Latinoamericanos de nutrición- **Organo oficial de la sociedade latinoamericana de nutricio**, Vol 62, 2012.

PRELIPCEAN, A.A. The dynamics of total polyphenols, flavonoids and antioxidant activity of beepollen collected from Moldavia area, Romania. **Cercetări Agronomice in Moldova** vol. XLV , 2012.

PINO, LILIAN. M. **Estabilidade oxidativa da carne de frangos alimentados com diferentes fontes lipídicas, armazenada sob congelamento**. 2005. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência e

Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005.

POVH, Juliana A.; ONO Elizabeth O. Crescimento de Plantas *Salvia officinalis* sob Ação de Reguladores de Crescimento Vegetal. **Ciências Rural**. V.38. 2008.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, 2000.

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

RAVELLI, Débora. **Estabilidade Oxidativas de Óleo de Soja Adicionado de Extratos de Especiarias: Correlação Entre Parâmetros Físico-químicos e Avaliação Sensorial**. 2011. 114f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, 2011.

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

RIBEIRO, DANIELE S., MELO, DANIELA B., GUIMARÃES, ALÁISE G., VELOZO, EUDES S. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Seminário: Ciências Agrárias**, v.33, p. 687-696. 2012

ROBY, Mohamed H.H.; SARHAN, Mohamed A.; SELIM, Khaled A.H.; KHALEL, Ibrahim. Evaluation of Antioxidant Activity, Total Phenols and Phenolic Compounds in Thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.) and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops and Products**. v. 43, p. 827-831. 2013.

ROCHA, T. J. M.; DOS SANTOS, M. M. P.; SANTOS, K. C. B. S.; FILHO, B. P. N.; NOÉ, B. D. R.; DOS SANTOS, A. F. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE in vitro DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol. X (3), 54 – 63, 2013.

ROGINSKI, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, 2005.

ROQUE, VANIA. F. **Aproveitamento de resíduos de carne de frango: uma análise exploratória**. 1996. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 1996.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. **Comunicado Técnico 128, Embrapa** - Fortaleza, CE, 2007.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 1998.

SALEM, Issam B. FEKIH, Sana; SGHAIER, Haitham, BOUSSELMI, Mehrez; SAID, Mouldi; LANDOULSI Ahmed; FATTOUCH, Sami. Effect of Ionising Radiation on Polyphenolic Content and Antioxidant Potential of Parathion-treated Sage (*Salvia officinalis*) leaves. **Food Chemistry**. v. 141, p. 1398-1405. 2013.

SANTOS, Renata D.; MIGLIORANZA, Lúcia H. S. **Produto lácteo contendo fitoquímicos bioativos de extratos de especiarias**. 2007. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR. 2007.

SATO, GENI, S. A Produção e o Consumo de Proteína Animal no Brasil. **Revista Nacional de Carne**. São Paulo, n. 224, p 20-28, 1995.

SCHEEREN, M. B. **Desenvolvimento de pickles de frango com adição de diferentes antioxidantes e avaliação da qualidade e aceitabilidade dos produtos**. 2011. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos)- Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SCHIO, Elita et al. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Some Plant Extracts. *Phytochemical as Nutraceuticals- Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. 2012.

SCHMELZER-NAGEL, W. Patê: Novos aspectos tecnológicos. **Revista Nacional da carne**, n. 267, p.40-50, maio, 1999.

SCHOSSLER, L. S. **Estudo da viabilidade de microrganismo probiótico (*bifidobacterium lactis*) aplicado em produto cárneo cozido**. 2009. 76 f. Dissertação (Ciência e Tecnologia dos Alimentos)- Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

SHUIMANO, Marilis Y. H. **Ação Antioxidante de Extratos de Especiarias e Suas Misturas Binárias e Ternárias Sobre a Estabilidade Oxidativa de Óleo de Soja**. 2012. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, 2012.

SERAFINI, L. F; SCHIMIDT, C.A.P; KARLING, M; VECCHIA, P.D; SCHLEGER, I.C; CABRAL, I.S.R; CARPES, S.T. Evaluation of antioxidant potential of organic bee pollen heterofloral of *Apis mellifera*: a comparative study between two conditions of extraction. **16th World Congress of Food Science and Technology - IUFoST e XVII Latin American Seminar of Food Science and Technology - ALACCTA**, Foz do Iguaçu – Paraná, 2012.

SERAFINI, L. F. **Atividade antioxidante dos extratos de manjerona e pólen apícola: efeitos na qualidade de hambúrguer**. 2013. 136f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2013.

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

SILVA, Mayara G. F. da. **Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjeriço (*Ocimum basilicum* L.)**. 2011. 70 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Química – Bacharelado em Química Industrial/Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, 1999.

SOARES, DENISE J.; TAVARES, TARLIANE M.; BRASIL, ISABELLA, M.; FIGUEIREDO, RAIMUNDO, W.; SOUZA, PAULO, H.M; Processos oxidativos na fração lipídica de alimentos. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. Curitiba, v. 30, n. 2, p. 263-272, jul/dez 2012.

SOUZA, M. A. A. **Casca de batata inglesa (*Solanum tuberosum*) na proteção antioxidante da carne de frango**. 2006. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; AYRES, C. L. S. C.; ARAUJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAUJO, P. B. M.; BRANDAO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, jul. 2007.

TERRA, NELCINDO. N; MILANI, L.I.G; FRIES, L.L.M; URNAU, D; CIROLI, A; SANTOS, B.A. Extrato de erva mate (*Ilex paraguariensis*) como antioxidante, em carne de peru, submetida a tratamento térmico. **Higiene Alimentar**, v. 22, n. 166/167, p. 189-193, 2008.

TIVERON, ANA. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2010.

TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. In: **ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA e ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO**. Universidade do Vale do Paraíba, v. 1, p. 1963-1967.2007.

TUPE, R.S.; KEMSE, N.G. KHAIRE, A.A. Evaluation of Antioxidant Potentials and Total Phenolic Contents of Selected Indian Herbs Powder Extracts. **International Food Research Journal**. v.20, p. 1053-1063. 2013.

VENTURINI, KATIANI S.; SARCINELLI, MIRYELE F.; SILVA, LUÍS C. **Boletim Técnico in Características da Carne de Frango**. Universidade Federal do Espírito Santo- UFES. 2007.

VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 712p. 1992.

VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Feete, Seifen Anstrichmittel**, New York, v. 72, n. 12, p. 1084-1087, 1970.

YUNES, J. F. F. **Avaliação dos efeitos da adição de óleos vegetais como substitutos de gordura animal em mortadela.** 2010. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

XUE, X.; ZHAO, J.; CHEN, L.; ZHOU, J.; YUE, B.; LI, Y.; WU, L.; LIU, F. Analysis of coenzyme Q10 in bee pollen using online cleanup by accelerated solvent extraction and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 133, p. 573–578, 2012.