FLÁVIA CAROLINA VARGAS

Caracterização de extratos aquosos de Pitanga (*Eugenia uniflora* L), Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) e Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e sua aplicação para promover a estabilidade da carne bovina refrigerada

Pirassununga

2015

**Caracterização de extratos aquosos de Pitanga (*Eugenia uniflora* L),
Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) e Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e sua
aplicação para promover a estabilidade da carne bovina refrigerada**

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada à Faculdade
de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para
a obtenção do Título de Doutora em
Ciências.

Área de Concentração:
Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Paulo José
do Amaral Sobral

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

V297c Vargas, Flávia Carolina
Caracterização de extratos aquosos de pitanga
(*Eugenia uniflora* L.), guaraná (*Paullinia cupana* Kunth)
e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e sua aplicação para
promover a estabilidade da carne bovina refrigerada /
Flávia Carolina Vargas. -- Pirassununga, 2015.
125 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.
Orientador: Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral.

1. Mioglobina 2. Lipídios 3. Oxidação
4. Microbiologia 5. Antioxidante. I. Título.

DEDICATÓRIA

À minha mais que adorada família: Rodrigo, Joanna e Hórus.

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de agradecer primeiramente a Deus, Pai supremo, que permitiu que tudo isso fosse possível!

Aos meus queridos pais e irmão, que nesta caminhada estiveram sempre ao meu lado.

À minha irmã querida, que me deu apoio moral, intelectual e sentimental desde os primeiros passos desta etapa.

À minha maravilhosa família, e aos meus amadíssimos “primos de penca”, por todo o incentivo: “tamo junto”! Sempre!

Ao meu querido orientador, que sem nem me conhecer me aceitou como orientada, mesmo depois do susto de me ver pela primeira vez já “barriguda”.

À Profª Bete, que muito me incentivou ao retorno da vida acadêmica. À Profª Mariza Melo e ao Prof. Tonhão, por todos os ensinamentos. À Profª Andrezza (Palhazza,) pela paciência e amizade. Ao Prof. Júlio por toda ajuda!

Aos técnicos e especialistas de laboratório: Ana Mônica, Silvana, Rodrigo, Carla, Marcelo, Silvia, Flávia, Vanessa, Josi e Roseli, por tudo que me ensinaram, pelas conversas prazerosas e pelo carinho.

À Rosilda, pelo delicioso cafezinho, que muito ajudou nas manhãs e tardes de pesquisa...

Aos “Essenciais”, amigos, “brothers” e companheiros! Principalmente ao amadíssimo Lucas Arantes!

Às amigas queridas Camila Bitencourt e Juliana Baldin, que tanto me ajudaram em muitos ensaios...

A todos os colegas do LTA, especialmente às “super estagiárias” Patrícia, Thaís, Isabella e Karen.

Aos colegas Vitor, Thaysa, Volnei, e às Alessandras (Perê e Silva), por todo apoio.

Aos companheiros e colegas da Associação de Pós-Graduandos.

Aos meninos do Abatedouro, principalmente ao super prestativo Elso, que sempre esteve muito disposto a ajudar.

A todos aqueles que de alguma forma possibilitaram esse sonho: muito obrigada!

RESUMO

VARGAS, F. C. **Caracterização de extratos aquosos de Pitanga (*Eugenia uniflora* L), Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) e Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e sua aplicação para promover a estabilidade da carne bovina refrigerada.** 2015. 125 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

O uso de antioxidantes sintéticos para promover a conservação de alimentos tem sido alvo de questionamentos devido a possíveis efeitos tóxicos que estes podem causar. Desse modo, a utilização de substâncias naturais com poder antioxidante mostra-se uma alternativa bastante interessante. Além de conter compostos antioxidantes, muitas plantas também apresentam atividade antimicrobiana, o que tem sido alvo de interesse nas últimas décadas. A cor da carne bovina *in natura* é um de seus principais atributos, pois a maioria dos consumidores associa esta característica à qualidade do produto no ato da compra. A mioglobina, pigmento responsável pela cor vermelha da carne bovina, uma vez oxidada adquire coloração amarronzada e causa a rejeição da carne. Sua oxidação está ligada também ao processo de oxidação de lipídeos, que igualmente compromete a estabilidade deste produto durante a refrigeração. Desse modo, esta tese teve como objetivo caracterizar extratos aquosos de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), e avaliar sua aplicação na estabilidade da carne bovina moída refrigerada. Foram realizados 3 experimentos: 1) Caracterização dos materiais vegetais (composição centesimal, teor de clorofila e carotenoides totais) e extratos aquosos (cor, pH, teor de sólidos solúveis, atividade antioxidante pelos métodos do captura do radical DPPH[•] e o do radical ABTS^{•+} e capacidade redutora); 2) Estudo da estabilidade da carne bovina moída com extratos vegetais por meio de análises de cor, pH, atividade de água, oxidação lipídica (TBARS), oxidação da mioglobina e análises microbiológicas; e 3) Análise sensorial de cor e odor da carne bovina moída com extratos. Conclui-se que: os extratos vegetais de plantas nativas brasileiras, guaraná e pitanga, apresentaram melhor capacidade antioxidante; os extratos de pitanga promoveram a inibição do crescimento das bactérias testadas; o extrato de pitanga promoveu melhor estabilidade na oxidação de lipídios, além de ter apresentado ação antimicrobiana para bactérias psicrófilas na carne; a adição de extratos aquosos de pitanga e alecrim à carne bovina moída *in natura* refrigerada não

interferiu na preferência dos atributos de cor e odor, e ainda, que o atributo odor parece estar associado a preferências pessoais.

Palavras-chave: mioglobina, lipídios, oxidação, microbiologia, antioxidante.

ABSTRACT

VARGAS, F. C. **Pitanga (*Eugenia uniflora* L), Guarana (*Paullinia cupana* Kunth), and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) aqueous extract characterization and their application to promote beef stability during cold storage.** 2015. 125 f. PhD Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

The use of synthetic antioxidants to promote conservation of foods has been questioned due to possible toxic effects that such substances may cause, thereby the use of natural antioxidant sources seems to be a good alternative. Besides containing antioxidant compounds, many plants also have antimicrobial activity, which has been the subject of interest in recent decades. Color is one of the main attributes of fresh beef, since most consumers associate this characteristic to the quality of the product at the moment of purchase. Myoglobin, the pigment responsible for the red color of beef, once oxidized gets brownish and cause rejection of the product. This protein oxidation is also linked to the lipid oxidation process, which also impairs the stability of the product during cold storage. Thus, this thesis aimed at characterizing aqueous extracts Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves, and Guarana (*Paullinia cupana* Kunth) seeds, evaluating their use on the stability of ground refrigerated beef. The experiments were carried out in three steps, namely: 1) Characterization of plant materials (chemical composition, chlorophyll content and carotenoids) and aqueous extracts (color, pH, soluble solids content, antioxidant activity by the methods of radical DPPH[•] and ABTS^{•+} scavenging and reducing capacity); 2) Study of the stability of ground beef with plant extracts through color analysis, pH, water activity, lipid oxidation (TBARS), myoglobin oxidation and microbiological analysis; and 3) Sensory analysis of color and odor of ground beef with extracts. As conclusion, the plant extracts of Brazilian native plants, Guarana and Pitanga, showed better antioxidant capacity; Pitanga extracts promoted growth inhibition of the tested bacteria; Pitanga extract provided better stability in the oxidation of lipids, and has presented antimicrobial activity for psychotropic bacteria in the ground beef; the addition of aqueous extracts of Pitanga and Rosemary to fresh ground beef during cold storage for 6 days did not affect the preference of color and odor attributes; odor attribute of beef seems to be associated with personal preferences.

Keywords: myoglobin, lipids, oxidation, microbiology, antioxidant.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 HIPÓTESE	15
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
4.1 Principais Fatores Relacionados à Qualidade da Carne Bovina Refrigerada... 16	
4.2 Antioxidantes: tipos e mecanismo de ação.....	23
4.3 Pitanga (<i>Eugenia uniflora</i> L.)	34
4.4 Guaraná (<i>Paullinia cupana</i> , Kunth)	36
4.5 Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	37
5 JUSTIFICATIVA	40
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
6.1 Caracterização do Material Vegetal, Produção e Caracterização dos Extratos Aquosos	41
6.2 Estabilidade da Carne Bovina Moída com Extratos Vegetais.....	55
6.3 Análise Sensorial da Carne Bovina Moída com Extratos Vegetais.....	66
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
7.1 Caracterização do Material Vegetal e dos Extratos Aquosos.....	70
7.2 Estabilidade da Carne Bovina Moída Refrigerada com Extratos Vegetais	91
7.3 Análises Sensorial da Carne Moída com Extratos Vegetais.....	105
8. CONCLUSÕES	109
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
ANEXO 1	123
ANEXO 2	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Grupo prostético heme presente na estrutura química da mioglobina.	19
Figura 2 – Mecanismo geral da oxidação lipídica	21
Figura 3 – Mecanismo da ação supressora dos carotenoides (CAR) na presença de oxigênio singlete.....	27
Figura 4 – Estrutura química do licopeno (a) e do β -caroteno (b).	28
Figura 5 – Estrutura química dos ácidos fenólicos mais comuns: gálico e cafeico.....	29
Figura 6 – Estrutura química de dois flavonoides: antocianina e procianidina.....	29
Figura 7 – Estrutura química das diferentes formas de ácido ascórbico - ascorbato (AscH_2), ascorbil ($\text{Asc}[\bullet-]$) e deidroascorbato (DHAsc)	30
Figura 8 – Estrutura química do tocoferol.....	31
Figura 9 – Reação de redução da vitamina E pela presença de ácido ascórbico.....	31
Figura 10 – Folhas de pitanga (<i>Eugenia uniflora</i> L.).	35
Figura 11 – Sementes de guaraná (<i>Paulinia cupana</i> , Kunth) secas.	36
Figura 12 – Folhas de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>).	38
Figura 13 – Secagem das folhas de alecrim e pitanga em estufa com circulação forçada.	42
Figura 14 – Material vegetal em pó: alecrim (a), pitanga (b) e guaraná (c).	43
Figura 15 – Extratos de sementes de guaraná e de folhas de alecrim e pitanga em acetona 80%.....	44
Figura 16 – Placa de Petri com ágar solidificado e poços identificados para as diferentes concentrações de extrato.....	53
Figura 17 – Microplaca de 96 furos contendo os meios, os extratos com diluição seriada e a suspensão bacteriana de 10^7 em duplicata.	54
Figura 18 – Microplaca após incubação e adição de corante para a confirmação de crescimento bacteriano.	55
Figura 19 – Amostras de carne moída formatada acondicionadas em balcão expositor.	57
Figura 20 – Preparo das amostras para a realização das análises microbiológicas.	63
Figura 21 – Disco <i>PetrifilmTM Staph Express</i> 3M contendo um indicador e ácido desoxirribonucleico (DNA)	64
Figura 22 – Estrias de esgotamento durante a etapa de confirmação de colônias do gênero <i>Pseudomonas</i> spp.	65

Figura 23 – Tubos de ensaio contendo Ágar Kligler Ferro inclinado para teste de confirmação de <i>Pseudomonas</i> spp.....	66
Figura 24 – Amostras de carne moída acondicionadas em balcão expositor com iluminação.	67
Figura 25 – Amostras de carne moída, termo de consentimento e ficha de avaliação utilizados nas análises sensoriais.....	68
Figura 26 – Extratos aquosos de Pitanga, Guaraná e Alecrim.	74
Figura 27 – Gráficos sobre o tempo de estabilização dos extratos com o radical DPPH [•]	77
Figura 28 – Gráficos sobre o tempo de estabilização dos extratos com o radical ABTS ^{•+}	78
Figura 29 – Correlação entre os resultados das análises de captura do radical DPPH [•] e da capacidade redutora dos extratos aquosos.	85
Figura 30 – Correlação entre os resultados das análises de captura dos radicais DPPH [•] e ABTS ^{•+} dos extratos aquosos.	85
Figura 31 – Correlação entre os resultados das análises de capacidade redutora e captura do radical ABTS ^{•+} dos extratos aquosos.....	86
Figura 32 – Placas de Petri utilizadas para os testes de sensibilidade pelo método de poço difusão com os extratos de pitanga (formação de halos), guaraná e alecrim(sem a formação de halos) para a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	87
Figura 33 – Gráfico da variação dos parâmetros de cor L*, a* e b* das amostras de carne bovina moída refrigerada ao longo do período de vida de prateleira de 6 dias.....	91
Figura 34 – Evolução dos valores das médias gerais dos valores de TBARS nas amostras de carne moída ao longo do período amostral.....	95
Figura 35 – Gráfico geral das porcentagens das espécies de mioglobina encontradas na carne bovina moída refrigerada ao longo do período amostral de 6 dias.....	98
Figura 36 – Variação do teor geral de metamioglobina na carne moída ao longo do período amostral de 6 dias.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formas encontradas de mioglobina.	19
Tabela 2 – Classificação dos antioxidantes.	25
Tabela 3 – Principais pesquisas sobre a aplicação de fontes naturais de antioxidantes para preservação de carne bovina.	33
Tabela 4 – Cronograma de realização dos ensaios.	58
Tabela 5 – Composição centesimal em base seca (g/100g) das sementes de guaraná e folhas de pitanga e alecrim (médias $\pm$ desvio padrão).	70
Tabela 6 – Teores de Clorofila a (Cl a), Clorofila b (Cl b), Clorofila total (Cl total) e Carotenoides totais (mg/100g de matéria seca).	71
Tabela 7 – Teor de sólidos solúveis totais, rendimento e pH dos extratos vegetais (média $\pm$ desvio padrão).	73
Tabela 8 – Valores para os parâmetros L*, a* e b* de cor dos extratos (média $\pm$ desvio padrão).	74
Tabela 9 – Composição centesimal em base seca dos extratos de Pitanga, Guaraná e Alecrim (média $\pm$ desvio padrão).	75
Tabela 10 – Médias do teor de microminerais presentes nos extratos vegetais (mg/kg)	76
Tabela 11 – Médias do teor de macrominerais presentes nos extratos vegetais (g/100g)	77
Tabela 12 – Atividade antioxidante dos extratos vegetais pela captura do radical DPPH* (média $\pm$ desvio padrão).	79
Tabela 13 – Atividade antioxidante dos extratos pelo método de captura do radical ABTS ^{•+} (média $\pm$ desvio padrão).	81
Tabela 14 – Capacidade Redutora dos Extratos Vegetais (média $\pm$ desvio padrão)	83
Tabela 15 – Zonas de inibição (cm) dos testes de sensibilidade dos extratos de pitanga com as cepas utilizadas.	88
Tabela 16 – Concentração inibitória mínima (CIM) de extratos de pitanga para as cepas testadas.	90
Tabela 17 – Valores médios da a_w das amostras de carne bovina moída durante o período amostral.	93
Tabela 18 – Médias gerais dos valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas amostras de carne moída.	97

Tabela 19 – Logaritmos decimais das contagens de unidades formadoras de colônias por grama (Log UFC/g) de <i>Pseudomonas</i> spp. obtidas por ponto amostral na carne moída.	103
Tabela 20 – Logaritmos decimais das contagens de unidades formadoras de colônias por grama (Log UFC/g) de Coliformes totais obtidas por ponto amostral na carne moída.	103
Tabela 21 – Logaritmos decimais das contagens de unidades formadoras de colônias por grama (Log UFC/g) de Psicotróficos obtidas por ponto amostral na carne moída.	103
Tabela 22 – Totais das somas do teste de ordenação de preferência da cor da carne bovina <i>in natura</i> com extratos de pitanga (<i>Eugenia uniflora</i> L) e alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>).	105
Tabela 23 – Totais das somas do teste de ordenação de preferência do odor da carne bovina <i>in natura</i> com extratos pitanga (<i>Eugenia uniflora</i> L) e alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>).	108

1 INTRODUÇÃO

O nível de exigência imposto pelos consumidores por produtos alimentícios de qualidade vem aumentando notavelmente, principalmente pela facilidade de acesso às informações nutricionais (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Uma mudança global no papel dos consumidores é notória, de modo que estes passaram de passivos a ativos e atualmente impõe o que desejam consumir, sendo a preferência por alimentos saudáveis, principalmente aqueles que oferecem benefícios como saúde e bem-estar (AGUILERA, 2006).

A carne bovina *in natura* é um alimento bastante apreciado pelos consumidores, porém este item possui curta vida de prateleira, uma vez que é sensível a fatores como temperatura de processamento e armazenamento, presença de oxigênio, atividade enzimática, água, luz e presença de microrganismos (ZHOU; XU; LIU, 2010). Esses fatores podem ocasionar mudanças indesejáveis nos atributos de qualidade de produtos cárneos como cor, odor, textura e composição nutricional.

Um dos mais importantes atributos da carne bovina é a sua cor por exercer grande influência no ato da compra, uma vez que os consumidores associam esse atributo à qualidade da mesma (FAUSTMAN et al., 2010; TROY; KERRY, 2010). Parâmetros de qualidade como maciez e frescor também são bastante relevantes para o consumidor, porém, uma vez que no ato da compra esses fatores são dificilmente avaliados, a cor desempenha papel fundamental na qualidade que se espera do produto.

O pigmento responsável pela cor vermelha da carne bovina é a mioglobina. Uma vez oxidada, essa proteína adquire coloração amarronzada, causando a rejeição da carne no momento da compra. Além disso, a oxidação da mioglobina também está ligada ao

processo de rancidez (FAUSTMAN et al., 2010), potencialmente catalisando a oxidação de lipídeos e, assim, gerando compostos tóxicos e *off-flavor*.

No intuito de diminuir os prejuízos sofridos pela indústria de alimentos causados pela deterioração da carne bovina, algumas medidas têm sido incentivadas (ZHOU; XU; LIU, 2010), como, por exemplo, o desenvolvimento de embalagens com atmosfera modificada (ESMER et al., 2011; LUND; HVIID; SKIBSTED, 2007; MCMILLIN, 2008), desenvolvimento de embalagens ativas (CAMO et al., 2011) e uso de substâncias antioxidantes (ISMAIL et al., 2009; KIM et al., 2009). Dentre as medidas estudadas, a utilização de substâncias antioxidantes é mais difundida na indústria alimentícia através do uso de uma variedade de antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG) (RAMALHO; JORGE, 2006). O emprego destes antioxidantes, contudo, tem sido alvo de questionamentos quanto a sua inocuidade, uma vez que estudos toxicológicos demonstraram a possibilidade destes apresentarem algum efeito tóxico e carcinogênico (SOARES, 2002). Desse modo, está havendo um aumento no interesse pela substituição de antioxidantes alimentares sintéticos por naturais, além da intensificação pela procura de materiais vegetais contendo compostos potencialmente antioxidantes (OLIVEIRA et al., 2009; ARGOTI et al., 2011).

A atividade antioxidante das especiarias como o alecrim, o orégano, a canela e o cravo encontra-se amplamente documentada na literatura (FASSEAS et al., 2008; HOSSAIN et al., 2011; KONCZAK et al., 2010; KONG; ZHANG; XIONG, 2010; LU et al., 2011; NAGY et al., 2011). Essas espécies são descritas como boas fontes de compostos fenólicos. Várias outras espécies vegetais também são comprovadamente fontes de compostos com atividade antioxidante (ANESINI et al., 2012; KORNSTEINER; WAGNER; ELMADFA, 2006; WOJDYLO; OSZMIANSKI;

CZEMERY, 2007), no entanto, estudos sobre o potencial antioxidante de espécies vegetais nativas do Brasil como a pitanga e o guaraná ainda são muito escassos.

Além de conter compostos com comprovada ação antioxidante, os extratos de muitas plantas também apresentam notória atividade antimicrobiana, o que tem sido alvo de grande interesse nas últimas décadas (OTHMAN et al., 2011). Estudos sobre a ação antimicrobiana de extratos de plantas nativas como a pitanga e o guaraná, demonstraram a eficiência destes contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, além da ação sobre alguns fungos (BASILE et al., 2005; MAJHENIČ; ŠKERGET; KNEZ, 2007; OGUNWANDE et al., 2005; VICTORIA et al., 2012), o que denota o potencial destas espécies para serem utilizadas como fontes de compostos bioativos.

O uso de agentes antioxidantes e antimicrobianos naturais para aumentar a estabilidade da carne bovina mostra-se uma ótima alternativa considerando-se dois aspectos importantes: a possível toxicidade dos antioxidantes sintéticos utilizados atualmente e também o novo perfil consumista mundial, que busca alimentos mais saudáveis no que tange bem-estar e saúde, entretanto, desde que não afete as características sensoriais do produto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Esta tese teve como objetivo geral avaliar o efeito da adição de extratos aquosos de pitanga (*Eugenia uniflora* L.), guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) na estabilidade da carne bovina moída refrigerada.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste projeto são:

- ✓ Caracterizar o material vegetal quanto à composição centesimal e teor de clorofila e carotenoides totais.
- ✓ Caracterizar os extratos vegetais aquosos quanto a cor, pH, teor de sólidos solúveis, composição centesimal, composição mineral, atividade antioxidante, capacidade redutora e atividade antibacteriana.
- ✓ Avaliar o efeito da adição dos extratos vegetais na estabilidade da carne bovina moída e refrigerada, principalmente quanto às alterações oxidativas (mioglobina e lipídeos) e microbiológicas.
- ✓ Avaliar se a adição de extratos vegetais na carne bovina moída *in natura* refrigerada interfere na preferência dos provadores quanto aos atributos de cor e odor por meio de análises sensoriais.

3 HIPÓTESE

A hipótese desta tese é a de que o uso de extratos aquosos de sementes de guaraná e folhas de pitanga, plantas nativas brasileiras, e de folhas de alecrim pode retardar as reações de oxidação e a atividade microbiana na carne bovina moída refrigerada, e consequentemente retardar sua deterioração, propiciando o aumento de seu tempo de vida de prateleira, sem necessariamente influenciar no sabor do produto.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Principais Fatores Relacionados à Qualidade da Carne Bovina Refrigerada

4.1.1 Cor

A cor da carne bovina *in natura* é, indiscutivelmente, o atributo que mais influencia a decisão do consumidor, por ser o primeiro (ANDRÉS-BELLO et al., 2013) e um dos únicos atributos a que o consumidor tem acesso no ato da compra. Isso faz com que a cor da carne fresca esteja altamente associada à qualidade esperada deste produto.

Em se tratando de carne bovina, a coloração indicativa de frescor e qualidade para os consumidores é a vermelha intensa. Qualquer alteração neste padrão de cor, como o escurecimento ou mesmo o clareamento, será associada à ausência de qualidade por parte do consumidor. Há, contudo, grande variação nas tonalidades de cor entre os músculos presentes em uma mesma carcaça bovina, devido principalmente à concentração de mioglobina, à categoria animal e à localização do músculo na carcaça (CORNFORTH, 1994; FAUSTMAN; CASSENS, 1991). Além disso, diferenças entre espécies, raças e idade também são esperadas (RENERRE, 2000).

Além disso, destaca-se também o efeito do pH sobre a cor da carne de modo geral, que segundo Andrés-Bello et al. (2013) é muito complexo já que muitas das reações envolvendo o grupo heme são dependentes do pH do meio.

4.1.2 Atividade de Água (a_w)

A atividade de água está fortemente relacionada à qualidade da carne, tanto em se tratando das reações químicas, como em relação ao crescimento microbiano (BELL, 2001; SUN et al., 2002). De acordo com Sherwin e Labuza (2006), devido à forte correlação que existe entre as alterações de atividade de água e as taxas das reações que ocorrem em um alimento, muitos pesquisadores definem a_w erroneamente como sendo a razão entre a quantidade de “água disponível” para reações químicas e crescimento bacteriano e a quantidade de “água indisponível”, ou ainda entre “água livre” e “água ligada”. Segundo os mesmos autores, a atividade de água pode ser definida como “o estado de equilíbrio da umidade de um alimento em resposta ao equilíbrio da umidade relativa do meio em que este se encontra”. E ainda, que as alterações na a_w de um alimento irão resultar em alterações na quantidade de água solúvel, o que faz desta medida uma boa maneira de prever ou justificar as variações que ocorrem em um alimento, principalmente no que diz respeito ao crescimento microbiano.

Assim sendo, uma vez que a atividade de água permite o conhecimento do processo de adsorção que ocorre em um alimento em diferentes condições de umidade, podendo desta forma, auxiliar na predição da qualidade de um alimento, este parâmetro certamente pode ajudar a responder questões oriundas das alterações físico-químicas e microbiológicas da carne bovina ao longo de sua vida de prateleira.

4.1.3 Oxidação da Mioglobina

Como dito anteriormente, a coloração interpretada pelo consumidor como indicativo de frescor da carne *in natura* é a vermelho intensa. A descoloração ou mesmo o escurecimento causa rejeição dos produtos cárneos em geral (KIM et al., 2010; ZAKRYS-WALIWANDER et al., 2011).

Nos músculos dos vertebrados a coloração da carne depende particularmente da mioglobina, que é uma proteína heme-globular com peso molecular de aproximadamente 17.000Da com a função de armazenar e facilitar o transporte de oxigênio no músculo (RENERRE, 2000). Essa proteína quando oxidada adquire coloração amarronzada (FAUSTMAN et al., 2010) e causa a rejeição da carne bovina no ato da compra. Estudos sobre a oxidação proteica são bastante recentes, uma vez que até pouco tempo acreditava-se que os principais responsáveis pela deterioração dos alimentos eram a oxidação de lipídeos e a contaminação por microrganismos (LUND et al., 2011). As principais complicações decorrentes da oxidação proteica envolvem também a depreciação de outros atributos de qualidades como a textura, sabor, o aroma e o valor nutricional, porém a cor desempenha papel fundamental na qualidade que se espera do produto no momento da compra.

Na ausência de oxigênio, a forma reduzida da mioglobina, chamada de deoximioglobina, possui coloração vermelho escura, típica de músculos internos ou de superfície de carnes embaladas a vácuo. Quando exposta ao ar, essa mioglobina é oxigenada, conferindo à carne a coloração vermelho-cereja, que os consumidores normalmente associam ao frescor. Com a prolongada exposição ao oxigênio, ambas as formas podem sofrer oxidação e darem origem a metamioglobina, cuja coloração é

amarronzada e associada à ausência de frescor pelos consumidores (GILL, 1996; RENERRE, 2000). As variações nas colorações da mioglobina são determinadas pelo estado oxidativo e pelo tipo de molécula ligada ao átomo de ferro do grupo prostético heme, mais especificamente na 6ª posição coordenada, considerada um sítio de ligação livre (Figura 1).

Figura 1 – Grupo prostético heme presente na estrutura química da mioglobina.

Fonte: Própria autoria.

A Tabela 1 contém as algumas espécies de mioglobina que podem ser encontradas em carne, de acordo com Renerre (2000).

Tabela 1 – Formas encontradas de mioglobina.

Forma de Mioglobina	Estado oxidativo do Fe	Molécula ligada 6ª posição
Mioglobina	Fe^{+2}	H_2O
Deoximioglobina	Fe^{+2}	Nenhuma
Oximioglobina	Fe^{+2}	O_2
Metamioglobina	Fe^{+3}	H_2O

Fonte: Adaptado de RENERRE, M. Oxidative Process and Myoglobin. In: DECKER, E. C.; FAUSTMAN, C.; LOPEZ-BOTE, C. J. (Eds.). Antioxidants in Muscle Foods. New York: John Wiley & Sons, 2000. p. 113-133.

Segundo Faustman e Wang (2000), a interação entre a oxidação de lipídeos e da mioglobina não pode ser ignorada, uma vez que a mioglobina e outros compostos heme funcionam como pró-oxidantes nos tecido musculares (BARON; ANDERSEN, 2002; CHAIJAN, 2008). Após sofrerem oxidação, os grupos heme presentes na mioglobina podem ser “quebrados” (ESTÉVEZ; VENTANAS; CAVA, 2007), liberando as moléculas de ferro e assim, possibilitando a participação destas na geração de espécies reativas como o radical $\text{OH}^\bullet$ através das reações de Fenton e Haber-Weiss (LUND et al., 2011). Alguns autores afirmam ainda que as reações de oxidação podem teoricamente acontecer em ambos os sentidos entre lipídios e proteínas, contudo, é mais provável que os produtos derivados das reações lipídicas promovam a oxidação proteica (ESTÉVEZ; VENTANAS; CAVA, 2007; LUND et al., 2011), principalmente em se tratando de lipídios contendo grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, mais passíveis de oxidação, devido à presença de muitas duplas ligações.

4.1.4 Oxidação Lipídica

A oxidação lipídica é a reação de maior significância em todos os tecidos vivos, contribuindo negativamente para os atributos de qualidade da carne como descoloração, desenvolvimento de *off-flavor* e *off-odor*, problemas na textura, gerando ainda compostos potencialmente tóxicos ao longo do tempo (PEARSON et al., 1983).

Fatores como luz, pH, temperatura, concentração de mioglobina, presença de íons ferrosos e ácidos graxos insaturados podem influenciar este fenômeno (CHAIJAN, 2008; MONAHAN, 2000; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). De acordo com Ramalho e

Jorge (2006), a oxidação lipídica pode ocorrer de diferentes maneiras: reações hidrolíticas, oxidações enzimáticas, fotoxidação e autooxidação. Esta última é a principal via de oxidação de lipídeos (HAMILTON, 1995) e possui três etapas distintas: a iniciação, a propagação e a terminação (Figura 2).

Figura 2 – Mecanismo geral da oxidação lipídica

Fonte: RAMALHO, C. V.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos, São Paulo, v.29, n.4, 2006. p.755.

A fase de iniciação ocorre quando um átomo de hidrogênio é retirado da molécula de ácido graxo, formando um radical lipídico ($R^{\bullet}$) (Figura 2). Durante a fase de propagação, esse radical formado reage com oxigênio molecular e forma um radical peróxido ($ROO^{\bullet}$), o qual pode igualmente reagir com o hidrogênio de outro ácido graxo e dar origem a um radical hidroperóxido (ROOH) e a um novo radical lipídico, ocasionando assim uma reação em cadeia (MONAHAN, 2000; RAMALHO; JORGE, 2006). A fase de terminação ocorre quando dois radicais reagem entre si e formam compostos estáveis obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995; LIMA; ABDALLA, 2001; RAMALHO; JORGE, 2006),

originado desta forma os chamados produtos secundários como os aldeídos e as cetonas (FAUSTMAN et al., 2010), responsáveis pelo odor característico de rancidez em produtos cárneos.

Dentre os métodos de avaliação do grau de oxidação lipídica, existem aqueles voltados para a determinação de produtos primários, como teste de índice de peróxidos, e outros que visam quantificar a produção dos compostos secundários da oxidação lipídica, como o teste das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS). Este último, apesar de possuir algumas limitações, é frequentemente utilizado em ensaios para a determinação do grau de oxidação lipídica (LIMA; ABDALLA, 2001; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). O teste de TBARS reage principalmente com o malondialdeído ou malonaldeído, que em condições ácidas e altas temperaturas (100°C), reage com ácido 2-tiobarbitúrico formando produtos de coloração avermelhada, os quais absorvem no visível (532 nm) e podem ser determinados por absorção (LIMA; ABDALLA, 2001; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

4.1.5 Microbiologia da Carne

A carga microbiológica inicialmente presente na carne está diretamente relacionada ao estado fisiológico do animal durante o processo de abate e às condições sanitárias em que foram realizadas as etapas deste abate (MARSHALL; BAL'A, 2001; NYCHAS et al., 2008), como a sangria, a esfolagem e a evisceração. E, apesar de a composição nutricional da carne ser um meio ideal para a propagação de microrganismos deteriorantes e patógenos, apenas uma pequena porção destes sobrevive às condições de estocagem e distribuição (MARSHALL; BAL'A, 2001; ZHOU; XU; LIU, 2010).

A qualidade da carne pode ser alterada por dois grupos de microrganismos, os patogênicos, que causam doenças entéricas ou sistêmicas e infecções fatais à imunodeprimidos, crianças e idosos, e os deteriorantes, que alteram as qualidade nutricionais da carne por gerar, principalmente, descoloração, odores e aparecimento de secreções (MARSHALL; BAL'A, 2001; NYCHAS et al., 2008). Desse modo, a contaminação de um produto cárneo por microrganismos destes grupos pode levar a grandes perdas econômicas ou a sérios riscos à saúde pública.

Além das técnicas tradicionais de preservação da carne crua como a refrigeração, a radiação ionizante e a utilização de conservantes químicos, muitas outras tecnologias têm sido investigadas na busca de promover maior qualidade deste produto, dentre elas a utilização de conservante naturais, a aplicação de alta pressão hidrostática e a utilização de embalagens à vácuo, ativas ou antimicrobianas (ZHOU; XU; LIU, 2010).

4.2 Antioxidantes: tipos e mecanismo de ação

Uma definição bastante completa sobre o termo antioxidante foi dada por Halliwell e Gutteridge (2007, p.81): “qualquer substância que retarda, previne ou remove danos oxidativos a uma molécula alvo”. No Brasil, o termo antioxidante é classificado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1961) em seu Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, Art 2º como um “Aditivo para Alimentos”. No geral, aditivo deve ser uma substância ou mistura de substâncias,

“dotadas ou não de poder alimentício ajuntadas aos alimentos com a finalidade de lhes conferir ou intensificar o aroma, a cor, o

sabor ou modificar seu aspecto físico geral ou ainda prevenir alterações indesejáveis”.

Esse documento define antioxidante como sendo uma substância que retarda o aparecimento das alterações oxidativas nos alimentos. Tais alterações podem ocasionar a mudança de cor, sabor, textura e outros parâmetros descritos anteriormente, e ainda levar a problemas que vão desde a deterioração dos produtos alimentícios até o desenvolvimento de doenças degenerativas (ARGOTI et al., 2011) para quem os consome.

De acordo com Bailey (1996), para selecionar um antioxidante, deve-se verificar a presença de algumas propriedades: eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%); ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do alimento; ser compatível ao alimento e de fácil aplicação; ser estável durante o processo e armazenamento; e não ser tóxico, assim como os produtos de sua oxidação (BAILEY, 1996). O referido autor, em seu artigo sobre óleos e gorduras, propõe ainda uma classificação dos antioxidantes em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação dos antioxidantes.

Tipo de Antioxidante	Descrição
Primário	Compostos que podem atuar durante as fases de iniciação ou propagação da reação de peroxidação lipídica, através da doação de átomos de hidrogênio.
Sinergista	Compostos que podem aumentar a ação de antioxidantes primários quando associados corretamente.
Removedores de oxigênio	Substâncias que removem o oxigênio do meio, por meio de reações químicas estáveis, impedindo sua participação em outras reações. Exemplos: ácido ascórbico, ascorbatos, sulfito e eritorbatos.
Biológicos	Estão incluídas neste grupo muitas enzimas (glucose oxidase, superóxido dismutase e catalase), capazes de remover oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício.
Agentes quelantes	São espécies de sinergistas que imobilizam íons metálicos, que por sua vez, catalisam as reações de oxidação.
Antioxidantes mistos	São os antioxidantes que agregam dois ou mais dos compostos descritos anteriormente (CAMPOS; SABARENSE; PINHEIRO-SANT'ANA, 2008).

Fonte: BAILEY, A. E. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. 5. ed. New York: John Wiley, 1996.

4.2.1 Antioxidantes Sintéticos na Indústria de Alimentos

Os principais antioxidantes sintéticos utilizados pela indústria de alimentos são: butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), propil galato (PG) e terc-butil hidroquinona (TBHQ). No Brasil o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa 51 de 2006, regula a utilização de aditivos em carne e produtos cárneos (BRASIL, 2006). Para esse tipo produto alimentício, somente a utilização dos antioxidantes sintéticos BHA e BHT está autorizada.

O emprego destes antioxidantes tem sido alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade para a saúde humana, uma vez que estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade destes apresentarem efeitos tóxicos ou carcinogênicos (SOARES, 2002). O grande interesse na substituição de antioxidantes alimentares sintéticos por naturais despertou intenso interesse dos pesquisadores por materiais vegetais para a identificação de novos compostos com poder antioxidante (ARGOTI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2009).

4.2.2 Antioxidantes Naturais

Os antioxidantes naturais são compostos presentes abundantemente nas espécies vegetais (VELASCO; WILLIAMS, 2011), que possuem a capacidade de minimizar as reações de oxidação em um determinado meio. Muitas pesquisas apontam que diversas espécies vegetais são fontes de substâncias com potencial antioxidante tais como as vitaminas C e E, os compostos fenólicos como os flavonoides, os ácidos fenólicos, as cumarinas e os pigmentos como os carotenoides e a clorofila (KIM et al., 2013; KONG;

ZHANG; XIONG, 2010; MC CARTHY et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2009; SOARES, 2002; VELASCO; WILLIAMS, 2011; ZHOU; XU; LIU, 2010).

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis naturais responsáveis pela coloração alaranjada de frutas e outras espécies vegetais que podem ser sintetizados por plantas e microrganismos (PAIVA; RUSSELL, 1999; UENOJO; MÁRIO ROBERTO; PASTORE, 2007). São compostos formados por 40 carbonos, os quais podem estar associados somente ao hidrogênio (carotenos) ou possuir grupos funcionais oxigenados (xantofilas). Suas atividades biológicas estão relacionadas às suas propriedades físicas e químicas (KRINSKY, 1998).

A ação antioxidante dos carotenoides pode ocorrer através de diversos mecanismos, destacando-se a supressão de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), uma forma altamente reativa de oxigênio. De acordo com Krisnky (1998), os carotenoides são os mais eficientes supressores de oxigênio singlete encontrados na natureza. As reações apresentadas na Figura 3 representam o mecanismo de atuação dos carotenoides pela ação supressora de moléculas de oxigênio singlete.

Figura 3 – Mecanismo da ação supressora dos carotenoides (CAR) na presença de oxigênio singlete.

Fonte: adaptado de KRINSKY, N. The Antioxidant and Biological Properties of the Carotenoids. In: ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, 1998, New York).

Ao interagir uma molécula de oxigênio singlete, os carotenoides se tornam moléculas energeticamente excitadas, no entanto, ao invés de reagirem com outras moléculas, os carotenoides dissipam essa energia adquirida sob a forma de calor por meio

de uma série de interações com o meio. Desse modo, fazem com que seu estado energético retorne ao normal, o que os torna novamente disponível para suprimir outras moléculas de oxigênio singlete. A atividade supressora dos carotenoides está principalmente ligada ao número de ligações duplas conjugadas presentes em sua cadeia (PAIVA; RUSSELL, 1999).

Os carotenoides ainda podem agir como antioxidantes quando da interação com radicais livres, através da doação de elétrons, o que ocasiona a formação de radicais carotenoides. A reatividade do radical formado nessas reações é estabilizada pelo fenômeno de ressonância, propiciado por sua estrutura química (Figura 4), composta por várias duplas ligações alternadas (KRINSKY, 1998; PAIVA; RUSSELL, 1999; UENOJO et al., 2007; WIJNGAARD et al., 2012). Alguns carotenoides, contudo, podem ter ação pró-oxidante quando em altas concentrações, principalmente se em presença abundante de oxigênio (UENOJO et al., 2007).

Figura 4 – Estrutura química do licopeno (a) e do β -caroteno (b).

Fonte: adaptado de WIJNGAARD, H. et al. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin, Food Research International, v.46, n.2, 2012, p. 506.

Os compostos fenólicos são o maior grupo de fitoquímicos existentes nas espécies vegetais, sendo eles os fenóis simples, as cumarinas, os ácidos fenólicos, os flavonoides e os taninos (KING; YOUNG, 1999). Dentre as substâncias que compõe o grupo dos compostos fenólicos, merecem destaque os ácidos fenólicos (Figura 5), os flavonoides

(Figura 6) e os polifenóis por serem as substâncias mais conhecidas e estudadas (SOARES, 2002; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; RAMALHO; JORGE, 2006).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada à sua capacidade de sequestrar radicais livres e formar complexos com íons metálicos (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992). Os compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes nas etapas de iniciação e propagação da oxidação lipídica (RAMALHO; JORGE, 2006), através da doação de hidrogênio e elétrons, e também pela geração de radicais intermediários estáveis (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995).

Figura 5 – Estrutura química dos ácidos fenólicos mais comuns: gálico e cafeico.

Fonte: adaptado de WIJNGAARD, H. et al. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin, Food Research International, v.46, n.2, 2012, p. 508.

Figura 6 – Estrutura química de dois flavonoides: antocianina e procianidina.

Fonte: adaptado de WIJNGAARD, H. et al. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin, Food Research International, v.46, n.2, 2012, p. 509.

O ácido ascórbico e seus derivados (Figura 7), também conhecidos como vitamina C, são compostos hidrossolúveis e termo sensíveis encontrados em quantidades significativas em espécies vegetais e em órgão animais (JOHNSTON; STEINBERG; RUCKER, 2006). Segundo esses mesmos autores, a ação antioxidante do ácido ascórbico está em sua habilidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A vitamina C atua também em sinergismo com outros antioxidantes naturais, como o tocoferol, ou vitamina E (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992), principalmente na interface água-gordura, visto que este último composto é lipofílico.

Figura 7 – Estrutura química das diferentes formas de ácido ascórbico - ascorbato (AscH_2), ascorbil ($\text{Asc}[\bullet-]$) e deidroascorbato (DHAsc)

Fonte: adaptado de JOHNSTON, C. S.; STEINBERG, F. M.; RUCKER, R. B., Ascorbic acid. In: **Handbook of Vitamins**, 1 ed., 2006, p.491).

O tocoferol e seus derivados (α , β , γ e δ) são encontrados no óleo de espécies vegetais e sua denominação varia de acordo com a localização do grupo metila em seu anel (Figura 8), podendo assumir a denominação de α , β , γ ou δ (RAMALHO; JORGE, 2006).

Figura 8 – Estrutura química do tocoferol.

Fonte: adaptado de TRABER, M. G. Vitamin E. In: **Handbook of Vitamins**, 1 ed., 2006, p. 155.

Considerado um dos melhores antioxidantes naturais (RAMALHO; JORGE, 2006), a habilidade antioxidante do tocoferol está ligada a presença de outros antioxidantes, principalmente da Vitamina C, que auxilia a manutenção dos níveis de sua forma não oxidada, através da doação de hidrogênio (TRABER, 2006), como ilustrado na Figura 9.

Figura 9 – Reação de redução da vitamina E pela presença de ácido ascórbico.

Fonte: adaptado de TRABER, M. G. Vitamin E. In: **Handbook of Vitamins**, 1 ed., 2006, p. 155.

4.2.3 Antioxidantes Naturais em Produtos Cárneos

Apesar de serem amplamente aceitos pelos consumidores, os antioxidantes naturais são menos eficientes e mais onerosos do que os sintéticos (FASSEAS et al., 2008). Contudo, a utilização de fontes naturais de antioxidantes vem aumentando devido a uma maior demanda por produtos livre de conservantes (ARGOTI et al., 2011; FASSEAS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; VELASCO; WILLIAMS, 2011).

Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas sobre a utilização de antioxidantes naturais em alimentos cárneos nos últimos anos; (ALLEN; CORNFORTH, 2010; FASSEAS et al., 2008; INSANI et al., 2008; LIU et al., 2010; VELASCO; WILLIAMS, 2011). Segundo Velasco e Williams (2011), o uso de antioxidantes naturais em alimentos cárneos pode ocorrer em dois momentos distintos: pré-abate, através de incorporação de substâncias antioxidantes na dieta dos animais; e pós abate, através da aplicação direta de antioxidantes no alimento ou pelo uso de embalagens ativas.

A aplicação de antioxidantes na dieta animal já vem sendo estudada há bastante tempo (CHAN et al., 1996; DECKER; FAUSTMAN, LOPEZ-BOTE, 2000; INSANI et al., 2008; LYNCH et al., 1999; PHILLIPS et al., 2001), e ainda é tema de pesquisas na área de produção animal (MORÁN et al., 2012). Tais pesquisas comprovam a atividade antioxidante de substâncias naturais como o tocoferol, os carotenoides e o ácido carnosínico, quando fornecidas na dieta animal. Contudo, a viabilidade econômica da utilização desta prática para a obtenção de respostas satisfatórias são pouco abordados na literatura.

A aplicação de substâncias naturais antioxidantes diretamente em produtos cárneos é também uma alternativa bastante estudada (DJENANE et al., 2003; HOYLE PARKS et al., 2012; MC CARTHY et al., 2001; SÁNCHEZ-ESCALANTE et al., 2003; VELASCO; WILLIAMS, 2011), inclusive com o intuito de preservar a coloração da carne bovina (ALLEN; CORNFORTH, 2010; ISMAIL et al., 2009; LIU et al., 2010). A Tabela 3 contém as principais pesquisas sobre a aplicação de fontes naturais de antioxidantes para preservação de carne bovina.

Tabela 3 – Principais pesquisas sobre a aplicação de fontes naturais de antioxidantes para preservação de carne bovina.

Antioxidante natural	Material	Método de aplicação	Referência
Alecrim e ácido ascórbico	<i>Longissimus dorsi</i> (bifes de 100g)	Aspersão (2mL /bife)	Djenane et al. (2003)
Borragem (BO), alecrim (AL), orégano (OR) e ác. ascórbico (AA)	<i>Semimembranosus</i> moído	Mistura (1% BO; 2% BO; 0,02% OR; 0,1% OR; 0,05% AA; 0,1% AL; 0,1% AL + 0,05% AA)	Sánchez-Escalante et al. (2003)
Pimenta-do-reino, alcaravia, cardamomo, pimenta, canela, cravo, coentro, cominho, funcho, gengibre, noz-moscada, anis estrelado	Carne moída	Incorporação (0,1; 0,5 e 1% de cada tempero)	Vasavada, Dwivedi e Cornforth (2006)
Extrato de semente de uva	<i>Longissimus</i> bovino	Incorporação (0,1 e 1%)	Brannan e Mah, (2007)
Ác. ascórbico (AA), α -tocoferol (VitE) e sesamol (SE)	Carne bovina moída irradiada e não irradiada	Incorporação ou aspersão (0,05% AA; 0,01% VitE + 0,01% SE; 0,05% AA + 0,01% VitE + 0,01% SE)	Ismail et al. (2009)
L-carnosina, catequina e α -tocoferol	<i>Longissimus dorsi</i> moído	Incorporação (0,03mg/kg carne)	Liu et al. (2010)
Extrato de nó do rizoma de Lotus	<i>Biceps femoris</i> bovino moído	Incorporação (3%)	Huang et al., 2011)
Extrato de semente de Tâmara	Carne bovina moída	Incorporação (0,5; 0,75 e 1%)	Amany, Shaker e Abeer (2012)
Óleo essencial de alecrim	Carne bovina moída	Incorporação (0,01%)	Hoyle Parks et al. (2012)
Extrato de <i>Satureja hortensis</i>	Carne bovina moída	0, 100, 250 e 500ppm	Aksu e Özer (2013)

Fonte: Vide referências.

4.3 Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)

A pitanga é o fruto da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), que é uma planta amplamente distribuída nos países da América do Sul, incluindo Argentina, Brasil, Uruguai e Paraguai. No Brasil é encontrada nos estados Bahia, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SOBRAL et al., 2012).

Esta espécie pertence à família das mirtáceas, composta por mais de 100 gêneros e 3.600 espécies (CONSOLINI; SARUBBIO, 2002). A família apresenta frutos tipo baga, globulosos, carnosos e na sua maioria com semente única do tipo noz, que vão da coloração laranja-claro até roxo-escuro.

A família Myrtaceae tem seu perfil químico bem conhecido, caracterizado pela presença de vários constituintes importantes como taninos, flavonoides (quercetina, quercetrina e miricetina), mono e sesquiterpenos, triterpenos e derivados do floroglucinol, tanto nas folhas (Figura 10) como nos frutos (AMORIM et al., 2009; CRUZ; KAPLAN, 2005; OGUNWANDE et al., 2005; SCHMEDA-HIRSCMANN et al., 1987; VALERIANO et al., 2012).

Figura 10 – Folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.).

Fonte: Própria autoria.

As folhas de pitanga são utilizadas no preparo de infusões na medicina popular no tratamento de inflamações, febres, dores reumáticas, hiperglicemia, problemas estomacais e como substância diurética (AMORIM et al., 2009; AURICCHIO; BACCHI, 2003; CONSOLINI; BALDINI; AMAT, 1999), e seu uso como erva medicinal está previsto na legislação brasileira (ANVISA, 2006). Extratos da folha da pitanga têm mostrado pronunciada inibição do aumento da glicose e de triglicerídeos no plasma (MATSUMURA et al., 2000).

O óleo essencial das folhas desta espécie possui ainda atividade antioxidante (GARMUS et al., 2014; MARTINEZ-CORREA et al., 2011; VICTORIA et al., 2012), antimicrobiana e antifúngica (AURICCHIO; BACCHI, 2003; OGUNWANDE et al., 2005; SANTOS et al., 2012; SCHAPOVAL et al., 1994; VICTORIA et al., 2012), além de apresentar capacidade antioxidante maior em comparação com outras frutas cultivadas no Brasil, como o cupuaçu, a jabuticaba e a manga (SOUZA; OLIVEIRA; FERRI, 2002).

4.4 Guaraná (*Paullinia cupana*, Kunth)

O guaraná é a semente do guaranazeiro (*Paullinia cupana*, Kunth), pertencente à família Sapindaceae, e é originário da Amazônia, nativo da região Norte do Brasil nas áreas compreendidas entre os rios Amazonas, Maués, Paraná do Ramos e Negro, e na bacia do Rio Orinoco na Venezuela (FUKUMASU et al., 2006).

Esta espécie apresenta fruto pequeno e redondo, negro e brilhante, em forma de cápsula, e em seu interior há somente uma semente (Figura 11). Há aproximadamente 195 espécies desse gênero distribuídas na América tropical e subtropical, das quais pelo menos nove são descritas como nativas do Brasil, que é praticamente o único país a produzir guaraná em escala comercial em cultivos racionais e sistemáticos (SUFRAMA, 2003).

Figura 11 – Sementes de guaraná (*Paulinia cupana*, Kunth) secas.

Fonte: Própria autoria.

O guaraná é caracterizado quimicamente pela presença de compostos fenólicos antioxidantes além de compostos antimicrobianos. A composição química das sementes

desta espécie conta com alcalóides tipo metilxantinas (como a cafeína, a teofilina e a teobromina), taninos, ácido gálico, saponinas, amidos, polissacarídeos, pigmentos, colinas, catequinas, epicatequinas e epicatequinas galato (DALONSO; PETKOWICZ, 2012; HAMERSKI; SOMNER; TAMAIO, 2013; MAJHENIČ; KERGET; KNEZ, 2007; SIEDEMANN, 1998).

A atividade antimicrobiana (contra o crescimento de bactérias gram positivas e negativas) e antioxidante das sementes do guaraná foi reportada por alguns estudos (BASILE et al., 2005, MAJHENIČ; KERGET; KNEZ, 2007), com evidências na inibição do processo oxidativo espontâneo *in vitro*, devido ao elevado conteúdo de compostos fenólicos, principalmente os taninos (MAJHENIČ; KERGET; KNEZ, 2007). De acordo com Majhenič, Kerget e Knez (2007), os solventes orgânicos são mais eficientes na extração de compostos com ação antioxidante e antimicrobiana, uma vez que os extratos aquosos demonstraram pouca ou nenhuma ação.

Por ser classificado como agente termogênico, que estimula o metabolismo humanos devido à presença de cafeína, o guaraná tem recebido atenção especial pela indústria de alimentos, principalmente de bebidas (HAMERSKI; SOMNER; TAMAIO, 2013). Contudo, a utilização de extratos aquosos das sementes desta espécie em alimentos cárneos não foi encontrada na literatura consultada.

4.5 Alecrim (*Rosmarinus officinalis*)

Morfologicamente caracterizado como um arbusto de estatura baixa, o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) é uma espécie de erva da família Labiatae cultivado em todo o

mundo, principalmente na Espanha, Marrocos e Tunísia, que são também os principais produtores do seu óleo (FLAMINI et al., 2002) (Figura 12).

Figura 12 – Folhas de alecrim (*Rosmarinus officinalis*).

Fonte: Própria autoria.

A composição química do alecrim encontra-se bastante reportada na literatura, principalmente no que tange a presença de substâncias antioxidantes como os ácidos fenólicos [ácido cafeico, ferrúlico, rosmarínico – SHAN et al., (2005); WOJDYLO; OSZMIANSKI; CZEMERYYS, (2007)], os diterpenos fenólicos [ácido carnosínico, carnosol, epirosmanol – SAENZ-LOPEZ; FERNANDEZ-ZURBANO; TENA, (2002); THORSEN; HILDEBRANDT, (2003); SHAN et al., (2005)], os compostos voláteis [carvacrol – SHAN et al., (2005)] e os flavonóides [diosmetina, diosmina, luteolina e apigenina – BARROSO (1986); SHAN et al., (2005); WOJDYLO; OSZMIANSKI; CZEMERYYS (2007)].

Contudo, a composição química do óleo essencial desta erva é dependente de condições climáticas e de cultivos, da parte da planta usada, tipo de preparo do material

(*in natura* ou seco), bem como do método de extração empregado (ALMELA et al., 2006; SVOBODA; DEANS, 1992).

5 JUSTIFICATIVA

A escolha do alecrim se justifica pelo fato desta erva ser uma das mais estudadas quanto à capacidade antioxidante (DJENANE et al., 2003; HOYLE PARKS et al., 2012; KONG; ZHANG; XIONG, 2010; MC CARTHY et al., 2001; ÖZCAN; ARSLAN, 2011; SÁNCHEZ-ESCALANTE et al., 2003; STETZER; NOVAKOFSKI; BREWER, 2009; VELASCO; WILLIAMS, 2011), sendo dessa maneira um bom parâmetro de comparação com as demais plantas deste projeto. As outras duas espécies vegetais (pitanga e guaraná) foram escolhidas no intuito de se conhecer o potencial antioxidante das plantas nativas do Brasil, visto que poucos são os estudos encontrados na literatura a respeito das mesmas, constituindo assim, um ponto de originalidade desta tese.

A escolha pela utilização de extratos vegetais para aplicação em carne bovina moída ocorreu com a intenção de prolongar a coloração vermelho intensa da carne, por ser este o principal atributo associado à qualidade da mesma no ato da compra.

A carne moída foi escolhida por permitir maior facilidade de aplicação dos extratos vegetais, por permitir também maior superfície de contato e pela maior exposição de lipídeos e substâncias pró-oxidantes provenientes da quebra das paredes celulares ocasionadas pela cominuição do produto. Além disso, a utilização de carne moída possibilitou o reconhecimento inicial do comportamento da estabilidade da carne bovina refrigerada quando adicionada de extratos vegetais, o que poderá posteriormente auxiliar na utilização de fontes naturais de antioxidantes em produtos cárneos processados.

6 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos e análises que constam desta tese foram realizados no abatedouro-escola do Campus da USP de Pirassununga/SP, no Laboratório de Carnes do Departamento de Zootecnia (ZAZ) e nos Laboratórios de Tecnologia de Alimentos, de Processos de Engenharia de Alimentos, de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos e Multiusuário de Análise de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos (ZEA), da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP), Campus de Pirassununga, SP.

Foram realizados três ensaios experimentais:

- ✓ Caracterização do material vegetal e dos extratos aquosos.
- ✓ Estabilidade da carne bovina moída adicionada dos extratos.
- ✓ Análise sensorial da carne bovina moída adicionada dos extratos.

6.1 Caracterização do Material Vegetal, Produção e Caracterização dos Extratos

Aquosos

A caracterização do material vegetal e dos extratos aquosos foi realizada no intuito de escolher uma das espécies vegetais nativas (pitanga e guaraná) para a realização dos demais experimentos deste projeto de pesquisa, considerando-se, principalmente, o seu potencial antioxidante e antibacteriano.

6.1.1 Obtenção e Preparo do Material Vegetal

Sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) e folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) foram utilizadas para o preparo dos extratos aquosos (Figura 10, Figura 11 e Figura 12). As sementes de guaraná foram compradas em Belém/PA, enquanto as folhas de pitanga e alecrim foram obtidas de plantas da região de Pirassununga/SP.

As folhas de pitanga e alecrim foram colocadas em estufa de secagem com circulação forçada de ar a 65°C (KIM; CHO; HAN, 2013) por 72h (Figura 13). Tanto as folhas secas como as sementes de guaraná foram moídas em liquidificador doméstico e, posteriormente, peneiradas (48 *mesh*) para a uniformização das partículas. O pó obtido das folhas e sementes (Figura 14) foi acondicionado em frascos fechados ao abrigo da luz até o momento de preparo dos extratos aquosos, que não foi superior a uma semana.

Figura 13 – Secagem das folhas de alecrim e pitanga em estufa com circulação forçada.

Fonte: Própria autoria.

Figura 14 – Material vegetal em pó: alecrim (a), pitanga (b) e guaraná (c).

Fonte: Própria autoria.

6.1.2 Composição Centesimal do Material Vegetal

A composição centesimal das espécies vegetais foi determinada no pó das folhas de pitanga e alecrim e das sementes de guaraná. Para tanto, foram realizadas análises de matéria seca, matéria mineral, fibra bruta, extrato etéreo, proteína bruta e extrativo não nitrogenado, segundo metodologia descrita por Silva e Queiroz (2006).

A determinação da matéria seca foi realizada por gravimetria em estufa com circulação forçada a 105°C por 12h. Posteriormente, o pó seco foi incinerado em mufla a 550°C por 24h para a determinação da matéria mineral. A determinação da fibra bruta foi realizada por digestão em meio ácido, utilizando-se solução de ácido sulfúrico (1,25%) por 30 minutos. Em seguida, realizou-se digestão em meio básico com uma solução de hidróxido de sódio (1,25%) por 30 minutos. O material foi filtrado, lavado em água quente e colocado em estufa a 105°C por 24 horas.

A determinação do extrato etéreo foi realizada com o uso de Soxhlet e éter de petróleo para extração. A determinação de proteína foi feita pelo método de Kjeldahl, utilizando-se o fator de 6,25 para conversão de nitrogênio total em proteína bruta. A porcentagem de extrativo não nitrogenado foi calculada por diferença dos demais parâmetros.

6.1.3 Teor de Clorofila e Carotenoides das Espécies Vegetais

As análises relativas ao teor de clorofila total, clorofila a, clorofila b e carotenoides total foram realizadas segundo a metodologia descrita por Yang et al (1998). Inicialmente uma alíquota de 0,25g de amostra do pó de cada espécie vegetal foi adicionada de 5mL de um solução de acetona 80% para a extração de pigmentos. Em seguida, este extrato bruto foi centrifugado a 1.500g por 5min. Após o descarte do pellet (Figura 15), realizou-se a leitura das absorvâncias do sobrenadante nos seguintes comprimentos de onda: 663,6 (clorofila a), 646,6 (clorofila b) e 440,5nm (carotenoide).

Figura 15 – Extratos de sementes de guaraná e de folhas de alecrim e pitanga em acetona 80%.

Fonte: Própria autoria. Da esquerda para a direita: pitanga, alecrim e guaraná.

O conteúdo dos pigmentos foi calculado de acordo com as seguintes eq. (1), (2), (3) e (4):

$$Cl\ a = 12,25A_{663,6} - 2,55A_{646,6} \ (\mu\text{g/mL}) \quad (1)$$

$$Cl\ b = 20,31A_{646,6} - 4,91A_{663,6} (\mu\text{g/mL}) \quad (2)$$

$$Cl\ a+b = 17,76A_{646,6} + 7,34A_{663,6} (\mu\text{g/mL}) \quad (3)$$

$$Car = 4,69A_{440,5} - 0,267Cl\ a + b (\mu\text{g/mL}) \quad (4)$$

Onde: Cl a é a quantidade de clorofila a, Cl b é a quantidade de clorofila b, Cl a+b é a quantidade de clorofila total, Car é a quantidade de carotenoides totais; e $A_{663,6}$, $A_{646,6}$ e $A_{440,5}$ são os valores de absorbância obtidos nos comprimentos de onda 663,6, 646,6 e 440,5, respectivamente.

6.1.4 Preparo dos Extratos Aquosos

Os extratos aquosos foram preparados por dispersão de 1g/10mL utilizando-se o pó das plantas como soluto e água destilada como solvente. O processo de extração foi feito em banho termostático a 90°C (DELGADO ADÁMEZ et al., 2012; GOH; BARLOW; YONG, 2003) com o uso de agitador mecânico a 100rpm por 30 minutos. Após o resfriamento das soluções a temperatura ambiente, foi feita a filtração em papel filtro da marca Whatman nº1. Os extratos foram armazenados em ambiente refrigerado ao abrigo da luz por no máximo dois dias, até a realização das análises e/ou incorporação à carne bovina moída.

6.1.5 Análise Instrumental de Cor e pH dos Extratos

A análise instrumental da cor dos extratos foi realizada com um colorímetro portátil previamente calibrado (MiniScan XE Plus, HunterLab) com fonte de luz D65, ângulo de observação de 10° e abertura da célula de medida de 30mm de diâmetro. Os valores de cor foram expressos pelo sistema CIE L* a* b* de cor, em que o parâmetro L* indica a luminosidade da amostra, o parâmetro a* indica a variação de verde a vermelho, e o parâmetro b* indica variações do amarelo para o azul.

6.1.6 Determinação do Teor de Sólidos Solúveis Totais e Rendimento dos Extratos

O teor de sólidos solúveis totais (°Brix) e índice de refração dos extratos foram determinados utilizando-se refratômetro Abbe. O equipamento foi previamente calibrado com água destilada e a leitura das amostras foi realizada a 20°C.

O rendimento dos extratos foi calculado através da seguinte eq. (5):

$$R (\%) = \frac{V_f \times 100}{V_i} \quad (5)$$

Onde: R é o rendimento em porcentagem, V_f é o volume final de extrato em mL e V_i o volume inicial de água em mL.

6.1.7 Composição Centesimal e Perfil Mineral dos Extratos

A análise de composição centesimal dos extratos foi realizada por meio da metodologia de Silva e Queiroz (2006). Os extratos aquosos de cada uma das plantas utilizadas foram congelados em bandejas de alumínio e posteriormente liofilizados por 4 dias em liofilizador de bancada (FD 1,0-60, Heto).

O teor de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, e Zn foram determinados por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (SINDIRAÇÕES, 2013). As determinações dos teores de P, Na e K foram realizadas segundo metodologia pela AOAC (1996) de calorimetria (P) e fotometria de chama (Na e K). Análises de fluorimetria foram utilizadas para a determinação de Se (OLSON et al., 1975).

6.1.8 Estudo do Tempo de Estabilização dos Extratos com os Radicais ABTS^{•+} e DPPH[•]

Anteriormente à realização dos testes de capacidade antioxidante, foram realizados testes prévios no intuito de se conhecer o comportamento dos extratos vegetais quanto ao tempo de estabilização das reações com os radicais ABTS^{•+} 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Duas diluições de cada extrato foram utilizadas e a leitura das absorbâncias foi monitorada a cada 5 minutos para que se conhecesse tanto a cinética de cada erva, como o tempo total de estabilização das reações. Assim, os ensaios sobre a capacidade antioxidante puderam ser realizados com maior precisão.

6.1.9 Determinação da Capacidade Antioxidante dos Extratos

Foram utilizados dois testes para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos naturais, sendo eles o da captura do radical DPPH[•] descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e Rufino et al. (2007), e o método da captura do radical ABTS^{•+} descrito por Re et al. (1999). Segundo Wojdylo, Oszmianski e Czemerys (2007), esses métodos têm excelente reprodutibilidade, porém respondem de maneira diferente aos antioxidantes. Todos os testes se baseiam no mesmo princípio em que um radical sintético com absorbância característica a certo comprimento de onda é adicionado a uma substância com potencial antioxidante. À medida que a substância antioxidante reduz o radical sintético, há um decréscimo em sua absorbância, a qual é monitorada por meio de espectrofotômetro. Uma importante diferença é que o radical ABTS^{•+} pode ser dissolvido tanto em meio aquoso como em meio orgânico para a mensuração da atividade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos. Por outro lado, o DPPH somente pode ser dissolvido em meio orgânico, o que limita a interpretação de resultados quanto à ação de antioxidantes hidrofílicos (WOJDYLO; OSZMIANSKI; CZEMERYYS, 2007).

O método da captura do radical DPPH[•] permite a avaliação da atividade antioxidante de um composto através da sua capacidade em doar hidrogênio a um radical, o que de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), depende da quantidade de grupos hidroxis disponíveis em sua estrutura química. Desse modo, o radical DPPH[•], que absorve em um comprimento de onda de 517nm, é reduzido na presença de um composto antioxidante, formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), e passa de uma coloração violeta à amarela, ocasionando o decréscimo da absorbância (OLIVEIRA et

al., 2009). Para este método foram realizadas 10 diluições dos extratos em álcool etílico 99% em triplicata, para que fosse obtida a equação da reta que permitiu o cálculo da inibição da absorção. As amostras (500µL) foram acrescidas de álcool etílico 99% (3mL) e do reagente DPPH previamente diluído em álcool etílico 99% (300µL) a uma concentração de 60µM. A leitura das absorbâncias foi realizada após o tempo de reação de cada uma das plantas com radical DPPH[•] em espectrofotômetro a 517nm. Para a interpretação dos resultados foi utilizado o cálculo do EC₅₀, que leva em consideração a quantidade de substância antioxidante necessária para a redução da absorbância do radical DPPH[•] em 50%.

O modo de ação do método da captura do radical ABTS^{•+} é através da capacidade de transferência de elétrons de uma substância. O radical estável ABTS^{•+} de coloração azul é gerado através da reação de oxidação do 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) com a utilização de persulfato de potássio. A descoloração do radical estável ABTS^{•+}, medida a uma absorbância de 734nm, indica a atividade antioxidante de uma substância. Para este método foram utilizadas duas diluições de cada extrato em triplicata. Como mencionado anteriormente, foi necessária a preparação prévia do radical pela reação de uma solução do reagente ABTS com água destilada (7mM) e uma solução de persulfato de potássio a 140mM. Essa solução permaneceu no escuro em temperatura ambiente por no mínimo 16h. Após esse período, a absorbância da solução do radical foi corrigida para 0,7 unidades de absorbância em espectrofotômetro a 734nm, com a utilização de álcool etílico 99% para a diluição. Uma vez atingida essa absorbância, alíquotas de 30µL de cada diluição dos extratos foram adicionadas de 3mL de solução do radical ABTS^{•+} e a leitura das absorbância foi feita no tempo necessário para a estabilização de cada erva com esse radical. Foi ainda realizada uma curva de calibração com o antioxidante sintético TROLOX (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido

carboxílico) para a interpretação dos resultados, que foram expressos em TROLOX equivalente.

6.1.10 Determinação da Capacidade Redutora dos Extratos

A determinação da capacidade redutora dos extratos foi realizada através do método descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999) com o uso do reagente de *Folin-Ciocalteu* e a utilização do ácido gálico como padrão para a realização das curvas de calibração. Este método é um ensaio colorimétrico que se baseia em uma reação química de redução de óxidos de tungstênio e molibdênio (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). O reagente de *Folin-Ciocalteu* é uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico, em que o molibdênio possui a coloração amarela. Quando esses ácidos se deparam com substâncias que têm poder redutor, ou seja, antioxidantes como os compostos fenólicos e outros, são formados os complexos molibdênio-tungstênio que possuem coloração azul (OLIVEIRA et al., 2009), o que permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, uma vez que a intensidade de absorção no comprimento de onda máximo de 765nm é proporcional à concentração de fenólicos e outras substâncias redutoras (WATERHOUSE, 2002).

Foram analisadas duas diluições dos extratos em triplicata e oito concentrações de ácido gálico em duplicata para estabelecer a curva de calibração. As amostras e o ácido gálico (250µL) foram acrescidos de 2mL de água destilada, do Reagente de *Folin-Ciocalteu* (250µL) e de uma solução saturada de Na₂CO₃ (250µL). As reações ocorreram em banho-maria a 37°C por trinta minutos, e posteriormente realizou-se a leitura das absorbâncias das amostras em espectrofotômetro UV a 750nm.

Para a realização das análises de determinação da capacidade redutora dos extratos foram realizados testes prévios no intuito de se conhecer o comportamento dos extratos aquosos das plantas no que diz respeito à realização de curvas de calibração e estabelecimento das melhores diluições a serem utilizadas.

6.1.11 Determinação da Atividade Antibacteriana dos Extratos: Teste de Sensibilidade e Concentração Inibitória Mínima

Para a realização das análises de determinação da atividade antibacteriana dos extratos aquosos de pitanga, guaraná e alecrim foram utilizadas seis cepas das seguintes bactérias gram positivas: *Bacillus cereus*, ATCC 14579; *Bacillus subtilis*, ATCC 6623; *Escherichia coli*, ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923; e gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 15442 e *Salmonella* spp, ATCC 13076.

Foram realizados os testes preliminares de sensibilidade por meio do método de poço difusão de acordo com DUARTE et al. (2003) e MARTIN et al. (2012), os de concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição e o de concentração mínima bactericida (CMB) em ágar conforme preconizado por ALVES et al. (2008) e NCCLS (2003). Os testes de CIM e CMB foram realizados somente com o extrato de pitanga, por ter sido este o único extrato vegetal a apresentar resultados nos testes preliminares de sensibilidade.

Para a realização dos testes de sensibilidade por meio do método de poço difusão os extratos (3 repetições de cada extrato vegetal) foram filtrados em membranas com porosidade de 22 μ m e de diâmetro de 33mm, previamente autoclavadas, para assegurar a esterilidade dos mesmos. Após a filtragem, os extratos foram diluídos nas seguintes

proporções: 100% (2mL de extrato e 0mL de água destilada filtrada), 75% (1,5mL de extrato e 0,5mL de água destilada filtrada), 50% (1mL de extrato e 1mL de água destilada filtrada), 25% (0,5mL de extrato e 1,5mL de água destilada filtrada) e 10% (0,2mL de extrato e 1,8mL de água filtrada). Para o preparo do controle positivo, homogeneizou-se uma cápsula de Clorofenicol (antibiótico) em 20mL de água destilada filtrada em membrana com porosidade de 22µm e 33mm de diâmetro, previamente autoclavada.

Após o cultivo de 1mL das cepas de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp e *Staphylococcus aureus* em 10mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) ou da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* em 10 mL de caldo TSB (*Trypticase Soy Broth*) a 37°C por 24 horas, as suspensões bacterianas foram ajustadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625nm com a utilização da escala de Mac Farland 0,5Mac, que corresponde a 0,08 a 0,10 de absorbância, ou seja 1 a 2×10^8 UFC/mL. Posteriormente, 200µL do inóculo padronizado foi homogeneizado em 200mL de meio ágar Muller Hilton, previamente autoclavado e mantido a 45°C – 50°C, para a obtenção de uma concentração bacteriana de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL.

Os poços foram cortados como auxílio de uma ponteira estéril de 1000uL (8,5mm de diâmetro) após a solidificação do ágar e, em seguida, a parte cortada foi retirada com o auxílio de uma ponteira de 100uL igualmente estéril. Os poços foram identificados com os números das diluições (Figura 16) e 40uL das devidas soluções foram depositados em seus respectivos poços. No poço central foi colocado o antibiótico Cloranfenicol (controle positivo) e no poço de número 1 colocou-se água destilada (controle negativo).

Figura 16 – Placa de Petri com ágar solidificado e poços identificados para as diferentes concentrações de extrato.

Fonte: Própria autoria.

As placas permaneceram por 1 hora em temperatura ambiente para que o extrato pudesse ser difundido no meio. Após esse período, as mesmas foram incubadas a 37°C por 24 horas para que se realizasse a medição dos halos formados (zona de inibição). As zonas de inibição foram medidas com o auxílio do software de processamento de imagens *ImageJ* versão 1.47 em triplicata.

As análises de atividade antimicrobiana por microdiluição para a determinação da concentração mínima inibitória contaram com os mesmos procedimentos de esterilização dos extratos e cultivo de cepas realizados nas análises de teste de sensibilidade. A padronização das cepas ocorreu pelo ajuste das suspensões bacterianas a $1 - 2 \times 10^8$ UF/mL em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625nm com a utilização da escala de Mac Farland 0,5Mac. A suspensão bacteriana foi então diluída em caldo BHI ou TSB na proporção de 1:10 para se obter uma diluição de 10^7 UFC/mL.

Posteriormente, foram preparadas as microplacas estéreis de 96 furos com fundo em “U” pela adição de 95µL dos caldos BHI ou TSB nos 11 primeiros poços, em duplicata

para cada bactéria. Em seguida, foram realizadas as diluições seriadas utilizando-se 95µL do extrato de pitanga do primeiro poço (diluição de 50%) até o décimo (diluição de 0,1%). No décimo primeiro poço foi preparado o controle negativo com a adição de mais 95µL de caldo BHI ou TSB, e no décimo segundo poço foi preparado o controle positivo adicionando-se 40µL de solução de Clorofenicol (50mg/mL) e 55µL do respectivo caldo. Após esses procedimentos, inoculou-se 5µL da suspensão bacteriana de 10^7 em todos os poços e homogeneizou-se a placa com movimentos suaves. A placa foi coberta com um adesivo para microplacas (SealPlate, Sigma) e incubada a 37°C por 24 horas (Figura 17).

Figura 17 – Microplaca de 96 furos contendo os meios, os extratos com diluição seriada e a suspensão bacteriana de 10^7 em duplicata.

Fonte: Própria autoria.

Após a confirmação do crescimento bacteriano pela presença de turbidez no décimo primeiro poço (controle negativo), realizou-se a aplicação de 95µL do corante iodonitrotetrazolium chloride (Sigma I8377) na concentração de 2mg/mL em todos os poços. As leituras, realizadas após 3 horas, consistiram em visualizar a menor

concentração com inibição de crescimento bacteriano, sendo estas consideradas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) como pode ser observado na Figura 18.

Figura 18 – Microplaca após incubação e adição de corante para a confirmação de crescimento bacteriano.

Fonte: Própria autoria.

Para a realização dos testes de concentração mínima bactericida (CMB), inocularam-se 100µL do conteúdo de cada poço anterior àquele onde houve a concentração mínima inibitória em placas com ágar nutriente para incubação por 24 horas a 37°C. Após esse período, as placas foram recolhidas e analisadas para constatar o crescimento bacteriano.

6.2 Estabilidade da Carne Bovina Moída com Extratos Vegetais.

6.2.1 Obtenção, Preparo e Acondicionamento da Carne Moída

Os procedimentos experimentais de preparo e acondicionamento da carne moída foram realizados na sala de embutidos do abatedouro-escola da Prefeitura do Campus da

USP Pirassununga, SP. Foram utilizadas amostras do corte cárneo denominado acém, composto pelas massas musculares localizadas entre o pescoço e o filé-da-costela, compreendendo a porção torácica dos músculos trapézio, romboide, serrátil ventral, iliocostal e semi-espinhal, a porção dorsal do serrátil, o escaleno supracostal, o longo dorsal, os elevadores das costelas, os intercostais externos e internos e o longo do pescoço (GOMIDE; RAMOS; FONTES, 2006). Essas amostras, oriundas de animais da raça Angus, foram cedidas pela empresa VPJ Alimentos, às vésperas do início do período experimental. Anteriormente ao acondicionamento da carne moída foram retiradas as amostras para as análises de caracterização da matéria-prima.

Para avaliar a qualidade da carne moída adicionada dos extratos ao longo do tempo foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com esquema fatorial 2 x 4 com três repetições, sendo os fatores as plantas (2) e o tempo (4).

Foram realizados testes prévios para se estabelecer os níveis de inclusão dos extratos na carne moída. Testaram-se 6 níveis de inclusão (10, 5, 3, 2, 1 e 0,5mL/100g carne), com a avaliação sensorial da cor das amostras. Após a realização de testes prévios relativos aos níveis de inclusão, estabeleceu-se o nível de 0,1mL de cada extrato para cada 100g de carne moída. Anteriormente à incorporação, os extratos tiveram seus teores de sólidos solúveis totais corrigidos para manter as mesmas condições experimentais nesse sentido. A incorporação dos extratos foi realizada manualmente de modo a se obter amostras homogêneas, e para tanto, cada tratamento foi manipulado inicialmente pelo mesmo período de tempo. Ao fim do período, as amostras de carne, acrescidas ou não de extratos, foram dispostas lado a lado e comparadas quanto à dispersão da gordura na amostra. Caso alguma amostra se apresentasse menos homogênea, nova manipulação era feita.

Após a incorporação dos extratos, foram utilizados 100g de carne moída para a modelagem das mesmas no formato de hambúrgueres em uma prensa formatadora manual. As amostras de carne moída formatada foram alocadas individualmente em bandejas de poliestireno expandido, cobertas com filme de PVC. As embalagens foram dispostas em três prateleiras e os tratamentos foram distribuídos de maneira alternada de modo que todos estivessem expostos às mesmas condições internas. As amostras permaneceram acondicionadas em balcão expositor a $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 6 dias no intuito de simular as condições de varejo (Figura 19).

Figura 19 – Amostras de carne moída formatada acondicionadas em balcão expositor.

Fonte: Própria autoria.

6.2.2 Amostragem e Cronograma de Realização dos Ensaios

Os pontos amostrais ocorreram em dias alternados (dias 0, 2, 4 e 6), em que foram coletadas amostras da carne moída para a realização das análises físico-químicas e microbiológicas. O experimento foi realizado de acordo com o seguinte cronograma (Tabela 4):

Tabela 4 – Cronograma de realização dos ensaios.

Dia 0	Dia 2	Dia 4	Dia 6
✓ Análises de caracterização da matéria-prima.	✓ Análises de cor, pH e aw.	✓ Análises de cor, pH e aw.	✓ Análises de cor, pH e aw.
✓ Incorporação dos extratos à carne.	✓ Análise de mioglobina.	✓ Análise de mioglobina.	✓ Análise de mioglobina.
✓ Formatação e acondicionamento da carne moída.	✓ Análises microbiológicas .	✓ Análises microbiológicas.	✓ Análises microbiológicas .
✓ Análises de cor, pH e aw.	✓ Análise de oxidação lipídica (coleta de amostra).	✓ Análise de oxidação lipídica (coleta de amostra).	✓ Análise de oxidação lipídica (coleta de amostra).
✓ Análise de mioglobina.			
✓ Análises microbiológicas.			
✓ Análise de oxidação lipídica (coleta de amostra).			

Fonte: Própria autoria.

6.2.3 Avaliação Instrumental de Cor, pH e Atividade de Água (a_w)

Para a realização das análises instrumentais de cor da carne moída foi utilizado um colorímetro portátil previamente calibrado (MiniScan XE Plus, HunterLab), com fonte de luz D65, ângulo de observação de 10° e abertura da célula de medida de 60mm de diâmetro. Os valores de cor foram expressos pelo sistema CIE L^* a^* b^* de cor, em que o parâmetro L^* indica a luminosidade da amostra, o parâmetro a^* indica a variação de verde a vermelho, e o parâmetro b^* indica variações do amarelo para o azul.

O pH foi medido diretamente nas amostras de carne moída utilizando-se um pHmetro microprocessado portátil (PG 1400, Gehaka) com eletrodo de vidro e sonda metálica para ajuste de temperatura. Esse aparelho foi previamente calibrado com soluções tampão 4,01 e 7,01. Foram realizadas três medições em cada uma das amostras em triplicata, a fim de minimizar os erros decorrentes das medições.

A determinação da atividade de água das amostras de carne moída foi realizada com o auxílio de um medidor de atividade de água (CX-2 AQUA Lab, Decagon Inc.). Foram realizadas três medidas de cada amostra de carne formatada.

6.2.4 Análise de Oxidação Lipídica

Para a realização das análises de oxidação lipídica foram retiradas amostras de aproximadamente 6g carne moída de cada tempo amostral (0, 2, 4 e 6 dias), as quais foram congeladas em nitrogênio líquido após serem embrulhadas em papel alumínio e polietileno de alta densidade até o momento das análises. Foi realizado o teste de

substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS) para a determinação do nível de oxidação de lipídios, conforme metodologias propostas por Sorensen e Jorgensen (1996) e Vyncke (1970, 1975). Após o descongelamento em gelo, as amostras foram adicionadas de 15mL de ácido tricloroacético para a realização da homogeneização em Turrax por 60s em velocidade máxima. As amostras foram então filtradas em Whatman nº1 e 3mL deste filtrado, juntamente com 3 mL de ácido tiobarbitúrico foram colocados em tubos de ensaio com tampa. Os tubos foram incubados em banho-maria a 100°C por 40 minutos. Após este período realizou-se a leitura das absorbâncias a 532nm e 600nm, e os cálculos foram realizados com a utilização seguinte equação:

$$\text{TBARS (mg MDA/Kg de carne)} = \frac{C \times V_e \text{ (mL)} \times V_{\text{TCA}} \text{ (mL)}}{V_a \text{ (mL)} \times p \text{ (Kg)}} \quad (6)$$

Em que:

C = concentração da amostra, obtida através da curva padrão (µg/mL)

Ve = volume total do ensaio (mL)

VTCA = volume de TCA adicionado na amostra para homogeneização (mL)

Va = volume da amostra no ensaio (mL)

P = peso da amostra (kg).

6.2.5 Análise de Oxidação da Mioglobina

As análises de determinação das espécies de mioglobina foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Carlez, Veciana-Nogues e Cheftel (1995) e Krzywicki (1979), adaptada por Tang, Faustman e Hoagland (2004).

Para a realização desta análise, tomou-se o cuidado de utilizar a camada mais superficial de cada amostra, e possibilitar assim a retirada das parcelas que mais estivessem em contato com o oxigênio e a luz. Pesaram-se 2g das amostras de carne moída com precisão de duas casas após a vírgula, e homogeneizaram-se as mesmas em Turrax com 20mL de solução tampão de fosfato Na/K 0,04mol/L. Após 1 hora de repouso em gelo, centrifugaram-se as soluções a 10.000xg por 30 minutos em centrífuga refrigerada (10°C). O sobrenadante foi filtrado em Whatman n.1, seguido por filtração em membrana Millipore (0,22µm e 0,25 mm). As absorbâncias foram lidas em duplicata a 503, 525, 557 e 582nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de deoximioglobina, metamioglobina e oximioglobina, calculados com as eq. (7) (8) e (9), respectivamente, sendo a soma considerada como a concentração total de mioglobina (100%).

$$\text{Deoximioglobina (\% DeoMb)} = -0,543R_1 + 1,594R_2 + 0,552R_3 - 1,329 \quad (7)$$

$$\text{Oximioglobina (\% MbO}_2\text{)} = 0,722R_1 - 1,432R_2 - 1,659R_3 + 2,599 \quad (8)$$

$$\text{Metamioglobina (\% MetMb)} = -0,159R_1 - 0,085R_2 + 1,262R_3 - 0,520 \quad (9)$$

Onde: R_1 , R_2 e R_3 são razões entre as absorbâncias A582/A525, A557/A525 e A503/A525, respectivamente.

6.2.6 Análises Microbiológicas

Análises microbiológicas foram realizadas com a utilização de Placas 3M *Petrifilm*TM para contagem de microrganismos e também placas de Petri descartáveis de 90mm. Foi utilizado o Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001) como referência para preparo de amostras e meios.

As análises microbiológicas de caracterização da matéria-prima foram realizadas para verificar a contaminação pela espécie *Staphylococcus aureus*. Durante o período de estocagem foram realizadas análises para *Pseudomonas* spp., visto que esta é a espécie gram negativa dominante na deterioração de carne refrigerada (MARSHALL; BAL'A, 2001), e também para psicrotróficos aeróbicos e Coliformes a 45°C.

Foram retiradas 25g de amostra de cada tratamento, sendo que de cada uma das 3 bandejas de cada tratamento obteve-se aproximadamente 8g de carne (Figura 20). As amostras foram pesadas em sacos plásticos esterilizados (3M), onde foram adicionados 225mL de água peptonada previamente esterilizada, constituindo-se esta a diluição 10^{-1} . Diluições menores foram obtidas por meio da técnica de diluição seriada, com a adição de 1mL da amostra na diluição anterior em tubos contendo 9mL de água peptonada esterilizada. Este procedimento foi realizado tanto para a avaliação da matéria prima (determinação de *Staphylococcus aureus*) como para as demais análises microbiológicas

dos pontos amostrais, sendo que em cada ponto foram utilizadas no mínimo três diferentes diluições a fim de se conseguir contagens menores que 300 UFC.

Figura 20 – Preparo das amostras para a realização das análises microbiológicas.

Fonte: Própria autoria.

Para a determinação de *Staphylococcus aureus* na matéria prima foi utilizado o método oficial AOAC nº 2003.11, sendo o meio de cultura as placas *PetrifilmTM Staph Express* da 3M. Adicionou-se 1mL de amostra de cada diluição em cada uma das placas, as quais foram incubadas em estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h. Após este período observou-se a formação de colônias nas placas, e em caso positivo, a confirmação do gênero foi realizada utilizando-se disco *PetrifilmTM Staph Express* 3M contendo o indicador azul de toluidina para auxiliar na identificação das reações desoxirribonucleases (DNase). Os discos foram posicionados dentro das placas de *PetrifilmTM* (Figura 21) e as mesmas foram novamente incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por, no máximo 3 horas.

Figura 21 – Disco *Petrifilm™ Staph Express 3M* contendo um indicador e ácido desoxirribonucleico (DNA)

Fonte: Própria autoria.

Para as análises de determinação de coliformes totais à 45°C, foi utilizado o método oficial AOAC nº 989.10, em que os meios de cultura utilizados foram as placas *Petrifilm™* da 3M. Adicionou-se 1mL de amostra de cada diluição em cada placa, as quais foram incubadas em BOD a 45±1°C por 24 horas. Após este período as colônias típicas, vermelhas com formação de bolsas de gás ao redor, foram contadas em cada uma das diluições.

As análises de contagem de microrganismos aeróbios psicrotróficos foram realizadas pelo método oficial AOAC nº 990.12 utilizando como meio de cultura as placas *Petrifilm™* AC da 3M. Adicionou-se 1mL de amostra de cada diluição em cada placa, as quais foram incubadas em BOD a 7±1°C por 10 dias.

As análises relativas à determinação de bactérias do gênero *Pseudomonas* spp foram realizadas pelo método ISO 7218:2007 (ISO, 2010) com algumas modificações. Inicialmente, alíquotas de 0,1mL de cada diluição (mínimo de três) foram inoculadas em placas de Petri contendo Ágar Cetrimida Seletivo para *Pseudomonas* (105284, Merck

Millipore) pela técnica de plaqueamento em superfície com o auxílio de alças de Drigalsky estéreis em duplicata. As placas foram incubadas por 48h em BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Após este período, realizou-se a etapa de confirmação das colônias, em que se selecionaram as placas com contagem menor 300 colônias das quais foram retiradas de 3 a 5 colônias bastante isoladas. Essas colônias foram então submetidas a estriamento em superfície (estrias de esgotamento) com o auxílio de alças de níquel-cromo em placas contendo Ágar Nutriente (7145, Acumedia), as quais foram incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas (Figura 22).

Figura 22 – Estrias de esgotamento durante a etapa de confirmação de colônias do gênero *Pseudomonas* spp.

Fonte: Própria autoria.

Ao fim deste período, selecionou-se uma colônia isolada para a realização dos testes de confirmação de oxidase e crescimento em Ágar Kligler Ferro (7140, Acumedia). Para a realização do teste de oxidase, uma colônia das placas de estriamento foi retirada com o auxílio de palitos estéreis e em seguida espalhada sobre uma de tira de oxidase (Laborclin), contendo p-fenilenodiamina. O desenvolvimento de uma coloração azul em aproximadamente 10s indicou a confirmação do Gênero *Pseudomonas* spp (teste

positivo). Para a confirmação das colônias por meio do teste de crescimento em Ágar Kligler Ferro retirou-se igualmente uma colônia isolada das placas de estriamento e com uma agulha de inoculação, inoculou-se esta cultura em tubos contendo o ágar inclinado (Figura 23) pela técnica de picada e estrias na rampa. Os tubos foram então incubados por outras 24h a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ com as tampas levemente abertas para garantir condições aeróbicas.

Figura 23 – Tubos de ensaio contendo Ágar Kligler Ferro inclinado para teste de confirmação de *Pseudomonas* spp.

Fonte: Própria autoria.

Após o período de incubação observou-se o crescimento em rampa e a ausência de crescimento no fundo do tubo sem a produção de gás para a indicação de teste positivo.

6.3 Análise Sensorial da Carne Bovina Moída com Extratos Vegetais

Análises sensoriais relativas à cor e ao odor das amostras de carne moída crua adicionada dos extratos foram realizadas no Laboratório de Análises Sensoriais do Departamento de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de

Alimentos da USP nos dias 0, 2, 3 e 4 do período de estocagem. Utilizaram-se amostras de acém moído oriundas de animais da raça Angus cedidas pela empresa VPJ Alimentos, as quais permaneceram em balcão expositor com iluminação em temperatura de aproximadamente $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Figura 24).

Figura 24 – Amostras de carne moída acondicionadas em balcão expositor com iluminação.

Fonte: Própria autoria.

As análises de cor e odor foram realizadas separadamente, utilizando-se testes afetivos de preferência, em que cada provador organizou as amostras em ordem decrescente, ou seja, da mais preferida para a menos preferida (FERREIRA et al., 2000). Cada dia de análise sensorial contou com a participação de 100 provadores não treinados, e consumidores regulares de carne bovina (MEILGAARD; CIVILE; CARR, 1999).

As análises de odor foram realizadas anteriormente às análises de cor, e para que não houvesse influência da cor das amostras na avaliação de odor, utilizou-se uma lâmpada vermelha nas cabines de avaliação. Para a realização das análises de cor foi utilizada lâmpada branca.

Para cada dia de análise, os provadores receberam inicialmente o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO A), uma das fichas de avaliação (ANEXO B) de cada vez, juntamente com as 5 amostras de carne moída de aproximadamente 20g: controle (sem adição de extratos), pitanga 1 (adição de 0,1mL de extrato em 100g de carne), pitanga 2 (adição de 0,5mL de extrato em 100g de carne), alecrim 1 (adição de 0,1mL de extrato em 100g de carne) e alecrim 2 (adição de 0,5mL de extrato em 100g de carne) como consta na Figura 25.

Figura 25 – Amostras de carne moída, termo de consentimento e ficha de avaliação utilizados nas análises sensoriais.

Fonte: Própria autoria.

As 5 amostras foram identificadas com três dígitos elegidos de modo aleatório e dispostas simultaneamente em potes plásticos transparentes com tampa. A apresentação das amostras para os provadores foi realizada por blocos completos balanceados em ambas as análises.

Para a realização da análise estatística dos testes de ordenação de preferência obteve-se o valor crítico 61, o qual foi extraído da tabela de Newell e Macfarlane (1987) para 5 amostras e 100 respostas. Em função da ordem de preferência, atribuíram-se às amostras valores de 1 a 5, sendo que o valor 1 foi atribuído a amostra mais preferida e 5 para a menos preferida. Cada amostra teve seus 100 valores somados e a diferença entre os totais de cada amostra foi considerada significativa ao nível de 5% somente quando este valor foi ≥ 61 . Desse modo, as amostras com os menores ($p < 0,05$) valores totais foram consideradas as mais preferidas e aquelas com os maiores ($p < 0,05$) valores totais, as menos preferidas.

As análises sensoriais constantes nesta tese foram realizadas após aprovação pelo comitê de ética da FZEA/USP (CAAE: 26275813.2.0000.5422 – parecer: 535.687).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Caracterização do Material Vegetal e dos Extratos Aquosos

7.1.1 Composição Centesimal do Material Vegetal

Os resultados sobre a composição centesimal das sementes de guaraná e das folhas de pitanga e alecrim encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição centesimal em base seca (g/100g) das sementes de guaraná e folhas de pitanga e alecrim (médias $\pm$ desvio padrão).

Amostra	MS	MM	PB	FB	EE	ENN*
Pitanga	92,6 $\pm$ 0,2 ^a	8,9 $\pm$ 0,1 ^a	12,5 $\pm$ 0,6 ^b	13,5 $\pm$ 0,7 ^b	4,2 $\pm$ 0,5 ^{cb}	53,5 $\pm$ 0,2 ^a
Guaraná	90,1 $\pm$ 0,2 ^b	1,8 $\pm$ 0,0 ^c	14,8 $\pm$ 0,1 ^a	16,4 $\pm$ 0,1 ^a	3,4 $\pm$ 0,1 ^c	50,9 $\pm$ 0,2 ^b
Alecrim	92,4 $\pm$ 0,0 ^a	7,4 $\pm$ 0,0 ^b	10,5 $\pm$ 0,2 ^c	11,3 $\pm$ 0,2 ^c	12,1 $\pm$ 0,1 ^a	53,3 $\pm$ 0,0 ^a

Fonte: Própria autoria. MS – matéria seca, MM – matéria mineral, PB – proteína bruta, FB – fibra bruta, EE – extrato etéreo, ENN* – extrativo não nitrogenado por diferença. ^{a-c} médias seguidas por letras iguais não representam diferença estatística ($p < 0,05$).

As folhas de pitanga e alecrim apresentaram maior ($p > 0,05$) teor de matéria seca e extrativo não nitrogenado do que as sementes de guaraná. Por outro lado, as sementes de guaraná apresentaram as maiores médias de proteína bruta (PB) e fibra bruta (FB), seguidas pelas folhas de pitanga e por último as folhas de alecrim. As amostras de folhas apresentaram teor de minerais (MM) muito superiores ($p > 0,05$) às amostras de sementes de guaraná. Quanto ao teor de gordura (EE) das amostras, as folhas secas de alecrim destacaram-se das demais amostras por apresentarem média, aproximadamente, 4 vezes maior que as sementes de guaraná e 3 vezes maior que as folhas de pitanga.

Martins (2010) realizou análise da composição centesimal de amostras de guaraná em pó comercial e obteve valores muito similares aos obtidos neste estudo: 95,75g/100g de matéria seca, 12,84g/100g de proteína, 2,85g/100g de lipídios e 1,65 g/100g de matéria mineral.

Os resultados sobre a composição centesimal do alecrim estão em concordância com o observado por Polat, Yesilbag e Eren (2011), considerando-se matéria seca (94%), matéria mineral (7,95%) e teor de gordura (16,08 %). Contudo, os resultados sobre proteína bruta (5,5%), fibra bruta (25,24%) e extrativo não nitrogenado (39,4%) foram bastante diferentes, o que pode ser devido a diferenças de habitat, estágio de crescimento da planta ou mesmo período do ano em que foi feita a colheita da planta.

7.1.2 Teor de Clorofila e Carotenoides do Material Vegetal

Os resultados das análises sobre os teores de clorofila e carotenoides totais, descritos na Tabela 6, permitem a constatação da superioridade das amostras de folhas de alecrim e pitanga sobre as sementes de guaraná no que diz respeito ao teor de clorofila a, clorofila b e clorofila total.

Tabela 6 – Teores de Clorofila a (Cl a), Clorofila b (Cl b), Clorofila total (Cl total) e Carotenoides totais (mg/100g de matéria seca).

Amostra	Cl a	Cl b	Cl total	Carotenoides
Pitanga	116,18±18 ^a	54,98±9 ^a	171,16±27 ^a	29,65±4 ^a
Guaraná	3,25±0,9 ^b	3,70±1 ^b	6,95±2 ^b	28,75±5 ^a
Alecrim	113,72±11 ^a	55,49±8 ^a	169,22±20 ^a	30,43±4 ^a

Fonte: Própria autoria. ^{a-c} médias seguidas por letras iguais não representam diferença estatística (p<0,05). Os valores representam as média ± desvio padrão.

O teor de clorofila a encontrado nas folhas foi maior do que o teor de clorofila b, já que este é o maior componente da clorofila nas plantas verdes (ANDRÉS-BELLO et al., 2013). Especificamente sobre a clorofila a, essa superioridade chega a ser de quase 40 vezes para ambas as folhas estudadas, o que é esperado visto que esta parte das plantas tem a função fisiológica de realizar a fotossíntese (Tabela 6). Não foi observada diferença estatística ($p>0,05$) entre as três amostras quanto ao teor de carotenoides total.

Kim et al. (2013) reportaram valores de clorofila a variando de 5,06 a 44,21mg/100g de matéria seca em amostras de folhas de *Chrysanthemum coronarium* var. *spatiosum*, *Aralia elata*, *Cucurbita moschata*, *Pimpinella brachycarpa*, *Allium tuberosum*, *Brassica campestris* var. *chinensis*, *Acanthopanax sessiliflorum*, *Petasites japonicus*, *Glycine max*, e flores de *Brassica oleracea* var. *italica*. Esses mesmos autores também avaliaram os teores de carotenoides totais das mesmas plantas, tendo encontrado uma variação de 3,0 a 17,7mg/100g de matéria seca de planta.

Embora a clorofila tenha certa ação antioxidante em condições de ausência de luz (KIM et al., 2013), esta molécula é considerada fotosensibilizadora (RAMALHO; JORGE, 2006), ou seja, na presença de luz ela absorve energia luminosa e transfere para outra molécula, gerando uma espécie reativa (BERGER; HAMILTON, 1995). Nos sistemas biológicos, em presença de oxigênio, a clorofila pode ocasionar a formação da espécie reativa denominada oxigênio singlete (1O_2), que por sua vez leva à oxidação de outras moléculas de grande importância como os lipídios, DNA e proteínas. No entanto, os carotenoides possuem a capacidade de quelar esta espécie reativa de oxigênio e dissipar a energia absorvida após a reação sob a forma de calor, saindo assim do estado excitado

e retornando para seu estado fundamental (KRINSKY, 1998; UENOJO; MÁRIO ROBERTO; PASTORE, 2007).

7.1.3 Teor de Sólidos Solúveis Totais, pH, Rendimento e Cor dos Extratos

No que diz respeito ao teor de sólidos solúveis totais dos extratos vegetais, os extratos de pitanga se destacaram com as maiores médias ($p < 0,05$), seguidos dos extratos de alecrim e guaraná (Tabela 7).

Tabela 7 – Teor de sólidos solúveis totais, rendimento e pH dos extratos vegetais (média $\pm$ desvio padrão).

Extratos	Sólidos solúveis	pH	Rendimento
	(°Brix)		(ml/100ml)
Pitanga	3.63 $\pm$ 0,23 ^a	4.53 $\pm$ 0,14 ^c	43,83 $\pm$ 4,26 ^a
Guaraná	2.00 $\pm$ 0,17 ^c	5.94 $\pm$ 0,10 ^a	45,11 $\pm$ 9,45 ^a
Alecrim	2.60 $\pm$ 0,41 ^b	5.75 $\pm$ 0,09 ^b	30,62 $\pm$ 5,21 ^b

Fonte: Própria autoria. ^{a-c} médias seguidas por letras iguais não representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Com relação ao pH dos extratos, houve também diferença significativa entre as três amostras ($p < 0,05$), porém com valores bastante próximos entre os extratos de guaraná e alecrim. Os extratos de alecrim foram os que apresentaram os menores rendimento ($p > 0,05$), apesar de serem os extratos com maior velocidade de filtração.

As médias dos valores de cor CIE L*, a* e b* dos extratos vegetais estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores para os parâmetros L*, a* e b* de cor dos extratos (média $\pm$ desvio padrão).

Extratos	L*	a*	b*
Pitanga	31,89 $\pm$ 2,30 ^a	12,93 $\pm$ 1,36 ^c	43,83 $\pm$ 2,68 ^a
Guaraná	32,84 $\pm$ 5,68 ^a	21,55 $\pm$ 2,23 ^b	45,11 $\pm$ 13,05 ^a
Alecrim	19,17 $\pm$ 5,51 ^b	25,82 $\pm$ 1,54 ^a	30,62 $\pm$ 9,39 ^b

Fonte: Própria autoria. ^{a-c} médias seguidas por letras iguais não representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Pode-se afirmar, com base nos resultados obtidos, que os extratos de alecrim apresentaram as menores médias ($p < 0,05$) para a luminosidade e também para o parâmetro b* que vai do amarelo (valores positivos) ao azul (valores negativos), sendo portanto os mais escuros e com tonalidade menos amarela de todos os extratos, como pode ser observado na Figura 26. Já em relação ao parâmetro a* que mede a intensidade do vermelho (valores positivos) ao verde (valores negativos), os mesmo extratos obtiveram as maiores médias ($p < 0,05$), seguido dos extratos de guaraná e de pitanga, respectivamente.

Figura 26 – Extratos aquosos de Pitanga, Guaraná e Alecrim.

Fonte: Própria autoria.

7.1.4 Composição Centesimal e Perfil de Minerais dos Extratos

Os resultados relativos à composição centesimal dos extratos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para os teores de matéria seca, matéria mineral, proteína bruta e extrativo não nitrogenado. Os resultados não diferiram ($p > 0,05$) quanto aos teores de fibra bruta e lipídios (Tabela 9).

Tabela 9 – Composição centesimal em base seca dos extratos de Pitanga, Guaraná e Alecrim (média $\pm$ desvio padrão).

Amostra	MS	MM	PB	FB	EE	ENN*
Pitanga	95,89 $\pm$ 0 ^a	9,06 $\pm$ 0,07 ^b	6,97 $\pm$ 0,11 ^b	0,39 $\pm$ 0,42 ^a	1,04 $\pm$ 0,06 ^a	78,43 $\pm$ 0,17 ^a
Guaraná	95,76 $\pm$ 0,13 ^a	9,29 $\pm$ 0,14 ^b	42,66 $\pm$ 0,06 ^a	0,62 $\pm$ 0,14 ^a	1,46 $\pm$ 0,16 ^a	41,73 $\pm$ 0,64 ^c
Alecrim	94,87 $\pm$ 0,20 ^b	18,56 $\pm$ 0,11 ^a	6,51 $\pm$ 0,22 ^b	0,42 $\pm$ 0,14 ^a	1,47 $\pm$ 0,03 ^a	67,91 $\pm$ 0,48 ^b

Fonte: própria autoria. MS – matéria seca, MM – matéria mineral, PB – proteína bruta, FB – fibra bruta, EE – extrato etéreo, ENN* – extrativo não nitrogenado por diferença. ^{a-b} médias seguidas por letras iguais não representam diferença estatística ($p < 0,05$).

As amostras de alecrim apresentaram as menores médias de matéria seca e as maiores de matéria mineral ($p < 0,05$). Em relação ao teor de proteína bruta dos extratos, as amostras de guaraná apresentaram valores 4 vezes maiores ($p < 0,05$) que as amostras de folhas. Essa diferença, muito provavelmente, se deva à diferença de material vegetal utilizado para produzir os extratos. Os valores de extrativo não nitrogenado das amostras, que inclui em sua maior parte os carboidratos, foi obtido por diferença. As maiores médias foram dos extratos de pitanga, seguidos pelos extratos de alecrim e guaraná.

Os resultados das análises de perfil de minerais dos extratos encontram-se nas Tabela 10 e Tabela 11. Os resultados dos extratos de alecrim destacaram-se quanto aos teores altos do micromineral Selênio, que no organismo humano é considerado essencial e possui grande importância na composição do sistema antioxidante endógeno (CATANIA; BARROS; FERREIRA, 2009), assim como quanto ao teor do micromineral Ferro. Os extratos de pitanga se destacaram dos demais quanto ao teor do micromineral Zinco, que também tem ação antioxidante no organismo humano por diminuir o dano oxidativo nas células (PRASAD et al., 2004) e quanto ao teor de Manganês, que juntamente com o Cobre e o Ferro, catalisam as reações que geram espécies reativas como as autooxidações ou formação do radical OH[•] (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os extratos de sementes de guaraná apresentaram médias quanto ao teor de Cobre quase 3 vezes superiores às dos extratos de alecrim e quase 10 vezes superiores aos extratos de pitanga.

Tabela 10 – Médias do teor de microminerais presentes nos extratos vegetais (mg/kg)

Extrato/Micromineral	Se	Fe	Mn	Zn	Cu
Pitanga	0,085	22,63	29,61	57,00	4,48
Guaraná	0,098	21,74	13,80	43,44	37,38
Alecrim	0,100	34,00	25,48	35,97	13,37

Fonte: própria autoria.

No que diz respeito aos teores de macrominerais, os extratos de pitanga expressaram valores altos de Magnésio e Potássio (Tabela 11). Já os extratos de sementes de guaraná apresentaram valores altos para Sódio e Fósforo, porém valores muito baixos de Cálcio, em relação aos demais.

Tabela 11 – Médias do teor de macrominerais presentes nos extratos vegetais (g/100g)

Extrato/Mineral	Mg	Na	K	Ca	P
Pitanga	0,79	0,013	0,96	0,96	0,27
Guaraná	0,25	0,026	0,41	0,05	0,91
Alecrim	0,65	0,014	0,23	0,97	0,59

Fonte: própria autoria.

7.1.5 Estudo do Tempo de Estabilização dos Extratos com os Radicais ABTS^{•+} e DPPH[•]

Os testes de tempo de estabilização dos extratos com os radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] foram realizados para se conhecer a cinética de ação dos componentes antioxidantes presentes nos mesmos frente aos radicais e para determinar assim o intervalo de tempo necessário para realizar as medidas de absorbância durante as análises.

A Figura 27 contém os gráficos sobre o tempo de estabilização dos extratos de pitanga (A), guaraná (B) e alecrim (C) com o radical DPPH[•].

Fonte: Própria autoria. Extratos de pitanga (A), extratos de guaraná (B) e extratos de alecrim (C).

As reações dos extratos de pitanga com o radical DPPH[•] se estabilizaram mais rapidamente do que os demais extratos, por volta de 5min. As leituras das absorbâncias dos extratos de guaraná se estabilizaram após 30min e as amostras de alecrim alcançaram a estabilidade em, aproximadamente, 15min.

Os gráficos do tempo de estabilização dos extratos com os radicais ABTS^{•+} encontram-se apresentados na Figura 28.

Fonte: Própria autoria. Extratos de pitanga (A), extratos de guaraná (B) e extratos de alecrim (C).

Não foi possível obter o tempo de estabilização dos extratos frente ao radical ABTS^{•+} de maneira eficiente. Assim como o que foi observado por Re et al (1999), a reação dos extratos parecem ter dois tipos de fase, uma fase de queda rápida inicial, que segundo os autores deve-se aos grupo de maior poder redutor, seguida por uma fase lenta. Desse modo, optou-se por utilizar o tempo proposto no protocolo estabelecido por Re et al. (1999).

7.1.6 Determinação da Capacidade Antioxidante

Os resultados sobre a determinação da capacidade antioxidante dos extratos vegetais por meio do teste de captura do radical DPPH[•] foram expressos em EC₅₀, que corresponde à quantidade de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH[•]. Desse modo, quanto maior a atividade antioxidante de uma substância menor deve ser este valor. A Tabela 12 contém os resultados da atividade antioxidante dos extratos vegetais pelo método da captura do radical DPPH[•].

Tabela 12 – Atividade antioxidante dos extratos vegetais pela captura do radical DPPH[•] (média ± desvio padrão).

Extratos	EC₅₀* (mg/mL)
Pitanga	1,45 ^c ± 0.06
Guaraná	2,71 ^b ± 0.08
Alecrim	3,84 ^a ± 0.13

Fonte: Própria autoria. *EC₅₀ – Concentração necessária para reduzir em 50% a absorbância inicial do radical DPPH[•]. ^{a-c} médias seguidas por letras iguais não representam diferença estatística (p<0,05).

Para este teste, os resultados dos extratos de pitanga foram os menores (p<0,05) dentre os três extratos (Tabela 12). Os extratos de guaraná tiveram valores intermediários e os de alecrim foram os extratos com os maiores valores (p<0,05). Assim sendo, a atividade antioxidante dos extratos pode ser representada, comparativamente, da seguinte maneira: pitanga>guaraná>alecrim. De acordo com estes resultados, as espécies brasileiras estudadas apresentaram melhor atividade antioxidante que o alecrim, considerado um padrão dentre os antioxidantes naturais.

Garmus et al. (2014), com o intuito de maximizar a extração de compostos fenólicos de folhas de Pitanga testou extrações sequenciais em leito fixo usando CO₂ supercrítico, etanol e água como solventes. Estes autores reportam que o processo de extração sequencial etanólica foi o mais eficiente para extrair polifenóis totais, tendo apresentado valor de EC₅₀ de 9,15µg/mL.

Os valores de EC₅₀ obtidos por Victoria et al. (2012), na determinação da atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de pitanga, foi um pouco maior (0,83mg/mL), porém mais próximo ao que foi encontrado nesta tese.

Martinez-Correa et al. (2011) avaliaram a influência do processo de extração de folhas de pitanga sobre as propriedades antioxidantes e sobre o rendimento de compostos fenólicos. Esses autores obtiveram valores de EC₅₀ de 15±3µg/mL para extratos aquosos (60°C) e de 6,2±0,3µg/mL para extratos etanólicos (25°C), ambos realizados a pressão atmosférica. Os resultados para as extrações supercríticas seguidas de extração etanólica foram ainda melhores, de 5,2±0,1µg/mL

Estudando a capacidade de sequestrar radicais das folhas de alecrim provenientes de diferentes materiais (secas/frescas e cultivadas/nativas), Almela et al. (2006) produziram extratos metanólicos das folhas e obtiveram os melhores resultados para extratos secos de folhas frescas e folhas secas ao sol, cujos valores de EC₅₀ foram de 0,029 e 0,030mg.

Os autores Majhenič, Škerget e Knez (2007) obtiveram resultados de inibição do radical DPPH[•] superiores a 85% com extratos metanólicos, cetônico e etanólicos de sementes de guaraná. Assim como Martins (2010), que também relatou os melhores valores de inibição para as extrações com metanol e acetona.

Os resultados das análises sobre a atividade antioxidante dos extratos vegetais por meio da capacidade de sequestro de radicais ABTS^{•+} (Tabela 13) foram expressos em equivalente de TROLOX (TEAC), substância utilizada para realizar a curva de calibração. Este método mede a capacidade de transferência de elétrons de uma substância, que promove a descoloração do radical estável ABTS^{•+} a 734nm. Assim, quanto maior a descoloração da solução, maior a atividade antioxidante.

Tabela 13 – Atividade antioxidante dos extratos pelo método de captura do radical ABTS^{•+} (média $\pm$ desvio padrão).

Extratos	TEAC* (g Trolox/g matéria seca)
Pitanga	12,83 ^a $\pm$ 1,93
Guaraná	10,53 ^a $\pm$ 2,51
Alecrim	6,56 ^b $\pm$ 2,11

Fonte: Própria autoria. *Capacidade antioxidante em equivalente Trolox. ^{a-b} médias seguidas por letras iguais não representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os resultados dos extratos de pitanga e guaraná, contudo os resultados destes dois extratos foram significativamente superiores aos dos extratos de alecrim. As amostras de pitanga apresentaram valores aproximadamente duas vezes mais atividade antioxidante que os extratos de alecrim.

Em um estudo com extrato lipofílico comercial de alecrim, Gibis e Weiss (2012) relatam atividade antioxidante por meio de TEAC de $1,9 \pm 0,29$ mmol/g extrato, o que equivale a 0,47g/g. Wojdylo, Oszmianski e Czemerys (2007) analisaram extrato metanólico de alecrim e reportam que a atividade antioxidante encontrada foi de $96,9 \cdot 10^{-6}$ g Trolox/g de peso seco.

Ensaio do poder antioxidante pelo método ABTS do óleo essencial de folhas de pitanga realizados por Victoria et al. (2012) revelaram valores de EC_{50} de $8,1 \pm 0,20 \mu\text{g/ml}$.

Os resultados sobre a capacidade antioxidante dos extratos vegetais de plantas na literatura apresentam grande variação mesmo em se tratando de uma mesma espécie, o que pode ocorrer devido, muitas vezes, aos diferentes processos de extração (o que inclui variações no tempo de preparo, utilização de diferentes tipos de solventes e equipamentos), às diferentes metodologias de realização dos ensaios e às variações encontradas na própria composição das espécies vegetais devido à sazonalidade e à localização das mesmas.

No entanto, no presente estudo é possível perceber que enquanto os resultados da atividade antioxidante por meio da captura do radical DPPH[•] foram menores do que os encontrados na literatura, os resultados sobre a captura do radical ABTS^{•+} foram muito superiores aos artigos encontrados. Victoria et al. (2012) constataram que o óleo essencial de pitanga foi mais eficiente nas análises de ABTS, sugerindo que o principal mecanismo de ação antioxidante desta substância deve-se à capacidade de transferência de elétrons. Este fato pode, de certa forma, explicar o melhor desempenho dos extratos nos resultados das análises de captura de ABTS^{•+} em comparação com a literatura encontrada. Outra possibilidade para esta possível diferença quanto aos resultados do ABTS está relacionada com a maneira como os resultados foram expressos neste experimento, sempre em relação à base seca das matérias primas utilizadas para realização dos extratos.

7.1.7 Determinação da Capacidade Redutora dos Extratos

Os resultados dos ensaios sobre a capacidade redutora dos extratos aquosos, expressos em equivalente de ácido gálico, também apontam os extratos de pitanga como o de maior ($p < 0,05$) poder redutor dentre os três extratos estudados (Tabela 14). Os extratos de guaraná apresentaram valores intermediários e os extratos de alecrim apresentaram os menores ($p < 0,05$) valores de poder redutor.

Sabe-se que grande parte do poder redutor das amostras está relacionada ao teor de compostos fenólicos totais, porém estes não são os únicos compostos detectados pela utilização do Reagente de Folin-Ciocalteu. Outros compostos não fenólicos também podem interferir nos resultados, como a vitamina C (OLIVEIRA et al., 2009). Tendo isto em vista, optou-se por não denominar esta análise de determinação de compostos fenólicos totais.

Tabela 14 – Capacidade Redutora dos Extratos Vegetais (média $\pm$ desvio padrão)

Extratos	GAE* (g Ácido Gálico/g matéria seca)
Pitanga	0,739 ^a $\pm$ 0.095
Guaraná	0,613 ^b $\pm$ 0.070
Alecrim	0,445 ^c $\pm$ 0.076

*Equivalente de Ácido Gálico. ^{a-c} médias seguidas por letras iguais não representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Pelo fato de não haver muitas pesquisas relacionadas ao poder antioxidante de extratos aquosos simples das espécies estudadas, como os que foram realizados neste

experimento, optou-se pela discussão de resultados de extratos etanólicos ou mesmo relativos a outras espécies de plantas.

Analisando extratos comerciais de alecrim e de sementes de uva Gibis e Weiss (2012) reportam valores de 0,010 e 0,26g GAE/g extrato, respectivamente.

O processo de extração sequencial etanólica de folhas de pitanga realizado por Garmus et al. (2014) foi o mais eficiente para extrair polifenóis, segundo os autores, com valores de 0,24g GAE/g extrato.

A extração etanólica de sementes de guaraná a 8atm em temperatura ambiente realizada por Basile et al. (2005) expressaram valores de $0,00843 \pm 0,21$ g GAE/g, bem menores do que os obtidos neste experimento. Já os autores Majhenič, Škerget e Knez (2007) realizaram extração aquosa de sementes de guaraná a 100°C e reportaram valores maiores, de 0,119g GAE/g extrato de poder redutor. Os maiores poderes redutores obtidos por estes autores foram obtidos em extrações com solução de acetona 35% a 85°C (0,186g GAE/g extrato). Marins (2010) obteve valores de poder redutor de extratos aquosos de amostras comerciais de guaraná em pó de 0,047g GAE/g amostra, e valores de 0,152g GAE/g amostra para extratos com acetona a 35%.

No intuito de revalidar os resultados sobre o poder antioxidante dos extratos vegetais estudados, as análises de atividade antioxidante por meio da capacidade de captura de radicais livres, juntamente com as análises de poder redutor, foram correlacionadas (Figuras 29, 30 e 31). De acordo com Serpen, Gökmen e Fogliano (2012), amostras heterogêneas devem ser analisadas por mais de uma metodologia para que os diferentes aspectos das propriedades antioxidantes possam ser revelados.

Figura 29 – Correlação entre os resultados das análises de captura do radical DPPH[•] e da capacidade redutora dos extratos aquosos.

Fonte: Própria autoria.

Figura 30 – Correlação entre os resultados das análises de captura dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} dos extratos aquosos.

Fonte: Própria autoria.

Figura 31 – Correlação entre os resultados das análises de capacidade redutora e captura do radical ABTS^{•+} dos extratos aquosos.

Fonte: Própria autoria.

Como esperado, a correlação entre as duas análises de captura de radicais (ABTS^{•+} e DPPH[•]) apresentou o maior coeficiente (0,92), já que ambas as metodologias testam a habilidade das amostras em doar elétrons (ABTS) ou íons de hidrogênio (DPPH), cujo mecanismo é bastante similar. O coeficiente de correlação entre as análises de captura de radical DPPH[•] e ABTS^{•+} com as análises de poder de redução foi de 0,83 e 0,85, respectivamente, mostrando assim que os resultados estão concordantes e coerentes. Outra informação que pode ser extraída desses resultados está relacionada à ação antioxidante dos compostos fenólicos das amostras, os quais estão diretamente ligados ao poder de redução das mesmas, ou seja, quanto maior o teor destes compostos, maior a ação antioxidante. Muitas pesquisas apontam os compostos fenólicos como os principais responsáveis pelo poder antioxidantes de extratos vegetais (ARGOTI et al., 2011; DELGADO-ADÁMEZ, 2012; HOSSAIN et al., 2011; THOMAS et al., 2010).

7.1.8 Determinação da Atividade Antibacteriana dos Extratos: Teste de sensibilidade e Concentração Inibitória Mínima

Os testes de sensibilidade pelo método de poço difusão revelaram atividade antimicrobiana para as cepas testadas apenas com a utilização dos extratos de pitanga. Os extratos de guaraná e alecrim não inibiram o crescimento de nenhum das bactérias utilizadas em nenhuma das concentrações testadas (10, 25, 50, 75 e 100%), uma vez que não houve a formação de halos ao redor do poço (Figura 32).

Majhenič, Škerget e Knez (2007) observaram que os extratos de sementes de guaraná com solventes orgânicos (metanol, acetona e etanol) propiciaram melhores resultados do que as extrações aquosas contra bactérias patogênicas. Zhang et al. (2008) encontraram zonas de inibição de 1,68, 1,63, 1,545, 0,98 e 1,46cm para as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Lactobacillus sake* utilizando extrações etanólicas de alecrim.

Figura 32 – Placas de Petri utilizadas para os testes de sensibilidade pelo método de poço difusão com os extratos de pitanga (formação de halos), guaraná e alecrim(sem a formação de halos) para a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Fonte: Própria autoria.

Como não houve atividade antimicrobiana nos testes de sensibilidade para os extratos de alecrim e guaraná, só foi possível medir o diâmetro dos halos formados (zona de inibição) para os extratos de pitanga. Foram considerados apenas os poços em que a concentração dos extratos foi de 100%, cujas médias e os respectivos desvios padrões encontram-se na Tabela 15. As placas contendo as cepas *Bacillus cereus* apresentaram contaminação em todas as repetições, evidenciando algum tipo de problema com a cepa, e por isso seus resultados foram desconsiderados.

Tabela 15 – Zonas de inibição (cm) dos testes de sensibilidade dos extratos de pitanga com as cepas utilizadas.

Bactéria	Cepa	Média ± DP do extrato	Média ± DP do controle
<i>Bacillus Subtillis</i>	ATCC 6623	2,12 ± 0,16 ^a	5,12±0,35
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	1,80 ± 0,18 ^b	4,25±0,30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	1,89 ± 0,24 ^b	2,97±0,96
<i>Salmonella</i> spp	ATCC 13076	2,09 ± 0,15 ^a	4,63±0,16
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	1,78 ± 0,12 ^b	4,41±0,27

Fonte: Própria autoria. ^{a-b} médias seguidas por letras iguais não representam diferença estatística (p<0,05).

As médias obtidas pela utilização do controle positivo (antibiótico Cloranfenicol) foram significativamente maiores (p<0,05) que as obtidas com a utilização dos extratos de pitanga. Porém, desconsiderando-se o efeito do antibiótico sintético, pode-se afirmar que estes extratos foram mais eficientes para inibir o crescimento das cepas de *Bacillus subtilis* (gram positiva) e *Salmonella* spp (gram negativa), pois estas apresentaram as maiores (p<0,05) zonas de inibição dentre as bactérias.

Os resultados de zona de inibição pelo uso de óleo essencial de folhas de pitanga obtidos por Victoria et al. (2012) para cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foram de 2,67, 1,01 e 0,80cm. Com exceção das zonas de inibição obtidas para *S. aureus*, os resultados destes autores foram aparentemente menores que os do presente estudo. Contudo, assim como a composição do óleo essencial das folhas de pitanga pode variar dependendo do momento da colheita, estação do ano e do estágio de maturidade (ADEBAJO; OLOKE; ALADESANMI, 1989), o mesmo deve ocorrer com os extratos aquosos. Além disso, diferentes cepas da mesma espécie de bactéria podem ter maior ou menor susceptibilidade aos compostos presentes nos extratos, o que igualmente explicaria a diferença de valores entre as pesquisas.

Os ensaios sobre a concentração inibitória mínima foram realizados apenas para os extratos de pitanga, visto que os demais não apresentaram efeito durante os testes de sensibilidade. As concentrações inibitórias mínimas foram determinadas como as menores concentrações com ausência de cor/turbidez. Os resultados da concentração inibitória mínima dos extratos de pitanga frente as cepas testadas encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16 – Concentração inibitória mínima (CIM) de extratos de pitanga para as cepas testadas.

Bactéria	Cepa	Média (mg/mL)
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	4,399 ^a
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6623	2,199 ^b
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	4,399 ^a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	0,137 ^c
<i>Salmonella</i> spp	ATCC 13076	4,399 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	4,399 ^a

Fonte: Própria autoria. ^{a-c} médias seguidas por letras iguais não representam diferença estatística (p<0,05).

Divergentemente do que foi observado nos testes de sensibilidade, as melhores (p<0,05) CIM foram obtidas para *P. aeruginosa*, mostrando que o extrato foi mais eficiente em inibir o crescimento desta espécie. Por outro lado, a CIM encontrada para *B. subtilis* foi a segunda menor, o que está em concordância com o obtido nos testes de sensibilidade. Para as demais bactérias não houve diferença significativa quanto à CIM.

Óleos essenciais de frutos e folhas de pitanga foram estudados quanto à atividade antimicrobiana por Ogunwande et al. (2005) e apresentaram valores abaixo dos obtidos neste experimento (0,625 e 0,039mg/mL para *B. cereus*, 0,039 e 0,156mg/mL para *S. aureus*, 0,625 e 0,625mg/mL para *E. coli* e *P. aeruginosa*, respectivamente). Isso pode ter ocorrido, pois os óleos essenciais têm alto teor de compostos com atividade antimicrobiana como os monoterpenos e os sesquiterpenos (AMORIM et al., 2009; OGUNWANDE et al., 2005; VALERIANO et al., 2012).

Victoria et al. (2012) também obtiveram valores bastante baixos de CIM para as bactérias gram positivas *S. aureus* (0,8 mg/ml) e *Listeria monocytogenes* (1,04 mg/ml) utilizando óleo essencial de folhas de pitanga.

7.2 Estabilidade da Carne Bovina Moída Refrigerada com Extratos Vegetais

7.2.1 Análises Instrumentais de Cor, pH e Atividade de Água (a_w) da Carne Bovina Moída Refrigerada

Os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* da carne bovina moída refrigerada não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos testados ($p>0,05$). Houve, porém, variação dos valores de cada parâmetro ao longo do tempo, de maneira geral, como pode ser observado na Figura 33.

Figura 33 – Gráfico da variação dos parâmetros de cor L^* , a^* e b^* das amostras de carne bovina moída refrigerada ao longo do período de vida de prateleira de 6 dias.

Fonte: Própria autoria.

Esses resultados indicam que a utilização de extratos aquosos vegetais de pitanga e alecrim na proporção testada não influenciaram os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* , visto

que estes não diferiram das amostras controle. Adicionalmente, a estabilidade das características de cor da carne também não foi alcançada com o uso destes extratos.

Os autores Kim et al. (2013) tampouco obtiveram uma ação protetiva do parâmetro a^* de amostras de carne bovina moída com adição de extratos hidroetanólicos (70%) de *Aralia elata* e *Pimpinella brachycarpa* (1g/20mL) após 12 dias de estocagem a $4\pm 1^\circ\text{C}$, apesar das amostras controle terem apresentado médias significativamente inferiores ($p < 0,05$) ao final do período de 12 dias.

Sánchez-Escalante et al. (2003) afirmaram que a aplicação de extratos de sementes de borragem (*Borago officinalis*) e extratos comerciais de orégano e alecrim em carne bovina moída apresentaram médias significativamente superiores ($p < 0,01$) às amostras controle do oitavo ao vigésimo dia de estocagem, sendo que as amostras com alecrim mantiveram valores de a^* acima de 10 até o décimo sexto dia de armazenamento.

De modo geral, todos os parâmetros de cor tiveram seus valores levemente diminuídos durante o período amostral de 6 dias, o que de certa forma é esperado ao longo da vida de prateleira, em que a carne pode perder a coloração vermelha intensa (a^*), devido a oxidação da mioglobina e também perda de água por evaporação, propiciando o escurecimento (L^*) das amostras.

As médias dos valores de pH das amostras de carne moída ao longo do período apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) apenas para o fator tempo, não tendo diferido entre os tratamentos ($p > 0,05$). Isso significa que, assim como os parâmetros L^* , a^* e b^* de cor, o pH não foi alterado pela adição dos extratos aquosos de alecrim e pitanga na proporção de inclusão utilizada.

Sánchez-Escalante et al. (2003) não obtiveram diferença estatística quanto ao valor de pH entre os tratamentos (controle, 1% borragem, 2% borragem, 0,02% orégano, 0,1% orégano, 0,05% ácido ascórbico, 0,1% alecrim, 0,1% alecrim + 0,05% ácido ascórbico incorporados à carne bovina moída), e nem mesmo ao longo do tempo, como foi observado neste experimento.

Apesar das médias de pH das amostras de carne terem apresentado diferença ($p > 0,05$) estatística entre os 4 pontos amostrais, os valores apresentaram variação, sendo o valor mínimo observado de 5,49 no tempo 0 e o máximo de 6,11 no tempo 6, com média de 5,88.

Os valores médios de a_w das amostras de carne moída apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) somente para os diferentes tratamentos utilizados (Tabela 17), não tendo variado ao longo do tempo. As amostras controle tiveram valores significativamente menores ($p < 0,05$) que os demais tratamentos, o que é um indicativo de que a adição de extratos aquosos vegetais de pitanga e alecrim na proporção de 0,1mL/100g de carne influenciou este parâmetro.

Tabela 17 – Valores médios da a_w das amostras de carne bovina moída durante o período amostral.

Tratamento	n	Médias $\pm$ DP
Controle	36	$0,9975 \pm 0,003^b$
Alecrim	36	$1,0000 \pm 0,002^a$
Pitanga	36	$1,0000 \pm 0,001^a$

Fonte: Própria autoria. ^{a-b} médias seguidas por letras iguais não representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Sun et al. (2002), estudando o efeito da atividade de água sobre a oxidação lipídica e a solubilidade de proteínas em carne bovina moída liofilizada por períodos diferentes para a geração de amostras com diferentes “endpoints” de atividade de água, verificaram que a a_w tem a capacidade de influenciar a estabilidade da oxidação lipídica durante o armazenamento. Esses autores sugerem que a oxidação lipídica da carne bovina moída medida pelo método de TBARS a 450nm foi favorecida em amostras com atividades de água baixas (0 a 0,33), ao contrário do que observaram para as amostras com atividade de água elevada (0,66 a 1), do mesmo modo como foi observado na presente pesquisa.

Nelson e Labuza (2009), por outro lado, afirmam que tanto em altas como em baixas atividades de água, as taxas de oxidação lipídica de um sistema são mais altas quando comparadas àquelas em que a a_w é intermediária.

Contraditoriamente, em uma revisão sobre as taxas de reações químicas em alimentos em função da atividade de água, Labuza (1968, p. 263-272 apud SHERWIN; LABUZA, 2006, p.346) afirmou que as taxa das reações em sistemas alimentícios aumentam exponencialmente até um valor máximo em atividades de água variando de 0,6 a 0,8, e que além destes valores de a_w as taxas decrescem¹. Segundo Sherwin e Labuza (2006) esse fenômeno pode ocorrer devido a uma série de fatores como mudanças na solubilidade e na viscosidade, gerando uma diminuição da concentração dos reagentes presentes.

¹ LABUZA, T.P. Sorption phenomena in foods, **Food Technology**, 22, p. 263-272, 1968.

7.2.2 Análise de Oxidação de Lipídica

Os resultados das análises relativas à oxidação de lipídios por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), expressos em equivalente de malondialdeído (MDA), revelaram diferença estatística ao longo do tempo (Figura 34) e também apresentaram efeito em relação aos tratamentos (Tabela 18), sem que houvesse interação entre os fatores tempo e tratamento.

As médias gerais dos valores de TBARS variaram significativamente ($p < 0,05$) de 0,3039 a 0,8824mg MDA/kg amostra do dia 0 ao dia 6 do período de estocagem. Muito embora outras substâncias presentes nas amostras de carne possam reagir com o ácido tiobarbitúrico, como alguns açúcares e mesmo outros aldeídos, este teste é muito utilizado para que se tenha ideia da evolução da oxidação de lipídios ao longo do tempo (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Figura 34 – Evolução dos valores das médias gerais dos valores de TBARS nas amostras de carne moída ao longo do período amostral.

Fonte: Própria autoria

Similarmente aos valores encontrados neste experimento, Kim, Cho e Han (2013) obtiveram variações de 0,380 a 0,984mg MDA/kg carne e 0,414 a 1,11mg MDA/kg carne em amostras de carne moída com incorporação de 0,1% extratos hidroetanólicos (70%) de *Aralia elata* e *Pimpinella brachycarpa* (1g/20mL) após 12 dias de estocagem a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.

No entanto, Allen e Cornfoth (2010) estudando a aplicação de ácido rosmarínico a 0,05% em carne bovina moída refrigerada (4°C) por 14 dias reportaram uma variação não significativa ($p>0,05$) dos valores de TBARS (0.23 ± 0.08 a 0.30 ± 0.10 mg MDA/kg carne) nas amostras.

As amostras de carne, logo após o segundo dia de estocagem, apresentaram forte *off-odor*, cuja ocorrência geralmente está associada à formação de aldeídos e cetonas, produtos secundários da oxidação lipídica. No entanto, de acordo com os ensaios realizados, os níveis destas substâncias neste determinado período de estocagem não justificaria a geração de odores. Desta forma, sugere-se que a presença de *off-odors* foi devida ao crescimento microbiano, especificamente à população de *Pseudomonas* spp. (NYCHAS et al., 2008).

O efeito do tratamento no teste de TBARS desta pesquisa encontra-se descrito na Tabela 18. As amostras Controle apresentaram médias maiores ($p<0,05$) que as amostras do tratamento Pitanga, sendo que as amostras do tratamento Alecrim apresentaram médias intermediárias. Esses resultados indicam que o extrato de Pitanga (1g/10mL) incorporado às amostras de carne moída na proporção de 1mL/100g foi eficiente em reduzir a oxidação lipídica da carne bovina moída refrigerada por um período de 6 dias. É importante ressaltar que apesar dos tratamentos Alecrim e Pitanga não terem diferido estatisticamente, as amostras do tratamento Pitanga apresentaram médias inferiores. Adicionalmente, o alecrim pode ser considerada como uma referência no que diz respeito

às pesquisas com a utilização de antioxidantes naturais oriundos de plantas, visto que são inúmeras as pesquisas com a mesma (KARRE; LOPEZ; GETTY, 2013). Tendo isso em vista, torna-se notável o potencial dos extratos de folhas de pitanga para retardar este tipo de oxidação em carne moída refrigerada.

Tabela 18 – Médias gerais dos valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas amostras de carne moída.

Tratamento	n	Médias $\pm$ DP (mg MDA/kg carne)
Controle	36	$0,67 \pm 0,04^a$
Alecrim	36	$0,56 \pm 0,04^{ab}$
Pitanga	36	$0,50 \pm 0,03^b$

Fonte: Própria autoria. ^{a-b} médias seguidas por letras iguais não representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Kim et al. (2013) avaliaram a atividade antioxidante e as propriedades nutricionais de 10 extratos comestíveis de plantas, juntamente com sua aplicação à carne bovina moída. Esses autores selecionaram dois extratos (*Petasites japonicus* e *Brassica oleracea* L. var. *italica*) com base na atividade antioxidante e no valor nutricional para a aplicação à carne moída e reportam que ambos extratos testados foram eficientes no controle da oxidação lipídica. Além destes vários outros autores relatam eficiência de extratos vegetais para inibir a oxidação lipídica (peróxidos e TBARS) em carne bovina crua (AKSU; ÖZER, 2013; AMANY; SHAKER; ABEER, 2012; BRANNAN; MAH, 2007; DJENANE et al., 2003; HUANG et al., 2011; YU; AHMEDNA; GOKTEPE, 2010)

7.2.3 Análise de Oxidação de Mioglobina

As frações relativas das espécies de mioglobina determinadas nas amostras de carne bovina moída estão apresentados na Figura 35. De modo geral estes resultados indicam que as maiores frações encontradas nas amostras são relativas à espécie oximioglobina, seguida pela espécie metamioglobina e, por último, pela espécie deoximioglobina, durante todo o período amostral.

Figura 35 – Gráfico geral das porcentagens das espécies de mioglobina encontradas na carne bovina moída refrigerada ao longo do período amostral de 6 dias.

Fonte: Própria autoria.

A espécie de mioglobina mais representativa das amostras de carne moída encontrada, oximioglobina, tem como característica a coloração vermelha intensa, e segundo esses resultados esta seria a coloração predominante das amostras. Contudo, no dia 4 do período amostral, as análises de cor instrumental relativas ao parâmetro a^* de cor que quantifica a intensidade do vermelho ao verde, contradizem os resultados das

análises químicas, pois relatam uma diminuição gradativa deste parâmetro. A confirmação desse fenômeno também pode ser observada por meio da correlação destas duas variáveis, cujo valor do coeficiente foi bastante baixo ($R^2=0,09$). Entende-se, com esses resultados, que a coloração vermelha, muitas vezes tida pelos consumidores como um indicativo de qualidade da carne bovina e cuja determinação por meio das análises instrumentais de cor está amplamente difundida na literatura, não necessariamente representa o estado oxidativo da proteína mioglobina. Assim, a utilização da leitura instrumental de cor realizada isoladamente, sem a corroboração das análises químicas, pode levar a interpretação errônea de dados relativos à qualidade estimada da carne bovina moída.

A produção de metamioglobina, forma oxidada da mioglobina, variou ao longo do tempo (Figura 36), porém não diferiu entre os tratamentos ($p>0,05$), indicando que a adição dos extratos vegetais de pitanga e alecrim na quantidade testada (0,1mL/100g carne) não contribuiu para prevenir ou reduzir a oxidação da proteína mioglobina, visto que as amostras do tratamento controle se comportaram como as demais amostras. KIM et al. (2013) avaliando a aplicação de extratos naturais com compostos polifenólicos em carne bovina moída tampouco observaram a estabilidade da coloração vermelha (a^*) da carne ao longo do tempo. Esses autores testaram a aplicação de extratos vegetais de duas espécies, *Brassica oleracea* L. var. itálica e *Petasites japonicus*, com a utilização de um controle positivo (antioxidante sintético BHT) e um controle negativo, contudo o efeito protetivo destes extratos não foi relevante.

Figura 36 – Variação do teor geral de metamioglobina na carne moída ao longo do período amostral de 6 dias.

Fonte: Própria autoria.

O teor de metamioglobina na carne moída apresentou, de modo geral, leve aumento durante os dois primeiros dias de vida de prateleira (Figura 36), seguido de uma diminuição bastante expressiva até o quarto dia, aumentando do quarto ao sexto dia de vida de prateleira. Uma vez que não houve diferença estatística entre as amostras com adição de extratos vegetais e as amostras controle (sem adição), sugere-se que a diminuição dos teores de metamioglobina da carne moída do segundo ao quarto dia esteja relacionada à ação do sistema antioxidante endógeno presente no músculo animal, mesmo após o abate (DESCALZO et al., 2007; SERPEN; GÖKMEN; FOGLIANO, 2012). Este sistema é composto por substâncias enzimáticas, como as enzimas superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase, e não enzimáticas, as quais ainda podem ser lipofílicas ou hidrofílicas, como a vitamina E, vitamina C, os polifenóis, os carotenoides, os tiois celulares e as ubiquinonas (DECKER; FAUSTMAN; LOPEZ-BOTE, 2000).

Estes resultados indicam que o efeito protetivo do sistema antioxidante endógeno pode atuar vários dias após o abate e ainda continuar protegendo a carne dos efeitos

degenerativos da oxidação. Em um estudo a respeito do efeito do tipo de músculo e taxa de queda do pH e temperatura sobre a atividade enzimática, Pastsart et al. (2013) comprovaram atividade das enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase até o décimo dia de estocagem refrigerada (4°C).

É importante ressaltar igualmente, que a ação do sistema antioxidante endógeno nas amostras de carne moída pode ter mascarado a atuação dos extratos vegetais, e que para que os antioxidantes naturais possam agir na inibição deste tipo de oxidação talvez seja preciso haver um esgotamento das fontes antioxidantes endógenas.

7.2.4 Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas de caracterização da matéria prima relativos à contaminação por *Staphylococcus aureus* foram realizados anteriormente à incorporação dos extratos nas amostras de carne moída para que, em caso positivo de contaminação, a atividade dos extratos contra essa espécie pudesse ser avaliada. No entanto, as amostras obtiveram resultados negativos para esta bactéria.

Os dados relativos às contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) foram transformados em logaritmo decimal para maior facilidade de interpretação, tendo sido expressos em log UFC/g amostra.

Os resultados relativos à contagem microbiológica das amostras de carne moída apresentaram interação entre os fatores tempo e tratamento para todas as bactérias analisadas ($p < 0,0001$), no entanto as regressões que foram ajustadas para estes dados não

expressaram o fenômeno a contento, e por isso optou-se por apresentar os dados sob a forma de tabelas.

De modo geral, os resultados permitem a percepção de que nenhum dos tratamentos apresentou um padrão consistente por todo o período de estocagem, como pode ser observado nas Tabela 19, 20 e 21.

No dia 0, as menores contagens ($p < 0,05$) de UFCs para todas as espécies avaliadas são relativas ao tratamento controle, o que é um forte indício de que os extratos utilizados já deveriam conter uma certa carga destes microrganismos, visto que o processo de produção dos mesmos não foi feito de maneira estéril.

No segundo dia de análises (dia 2), as contagens de bactérias não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre si, com exceção dos resultados de coliformes totais, em que o tratamento alecrim foi superior aos demais, tendo permanecido assim até o fim do período amostral. As menores médias ($p < 0,05$) obtidas neste dia para estes microrganismos foram encontradas para o tratamento Pitanga (Tabela 20). Vale ressaltar que no dia 2 do período de estocagem foi observado que todas as amostras já apresentavam limosidade superficial e *off-odor*. Uma vez que a alteração do odor não foi atribuída às substâncias geradas nas reações de oxidação, tendo em vista os resultados obtidos, sugere-se que o aparecimento destas características deva-se ao elevado número de unidades formadoras de colônias da espécie *Pseudomonas* spp. como mencionado por Nychas et al. (2008).

No quarto dia de estocagem as menores médias ($p < 0,05$) de contagens de UFCs de todas as bactérias foram obtidas também para as amostras com adição de pitanga.

No último dia de avaliação (dia 6) as menores médias ($p < 0,05$) na contagem de UFCs de *Pseudomonas* spp. e psicrotóxicos foram obtidas para os tratamentos Alecrim

e Pitanga, respectivamente. Sendo que, para as contagens de coliformes totais, não houve diferença significativa entre os tratamentos Controle e Pitanga.

Tabela 19 – Logaritmos decimais das contagens de unidades formadoras de colônias por grama (Log UFC/g) de *Pseudomonas* spp. obtidas por ponto amostral na carne moída.

Tratamento/Tempo	n	Dia 0	Dia 2	Dia 4	Dia 6
Controle	3	3,8 ^c	5,5 ^a	7,6 ^b	8,0 ^a
Alecrim	3	3,9 ^b	5,5 ^a	7,7 ^a	7,7 ^c
Pitanga	3	4,0 ^a	5,5 ^a	7,5 ^c	7,9 ^b

Fonte: Própria autoria. ^{a-c} médias seguidas por letras iguais não representam diferença estatística (p<0,05).

Tabela 20 – Logaritmos decimais das contagens de unidades formadoras de colônias por grama (Log UFC/g) de Coliformes totais obtidas por ponto amostral na carne moída.

Tratamento/Tempo	n	Dia 0	Dia 2	Dia 4	Dia 6
Controle	3	1,3 ^c	1,8 ^b	2,2 ^b	1,3 ^b
Alecrim	3	1,6 ^a	3,4 ^a	3,0 ^a	2,8 ^a
Pitanga	3	1,5 ^b	1,5 ^c	1,6 ^c	1,3 ^b

Fonte: Própria autoria.

Tabela 21 – Logaritmos decimais das contagens de unidades formadoras de colônias por grama (Log UFC/g) de Psicrotrofos obtidas por ponto amostral na carne moída.

Tratamento/Tempo	n	Dia 0	Dia 2	Dia 4	Dia 6
Controle	3	5,5 ^c	6,5 ^a	9,2 ^a	9,5 ^b
Alecrim	3	5,7 ^b	6,5 ^a	9,1 ^b	9,6 ^a
Pitanga	3	5,8 ^a	6,5 ^a	8,9 ^c	9,5 ^b

Fonte: Própria autoria.

De maneira geral, pode-se sugerir, com base nos resultados das análises microbiológicas da carne moída, que o tratamento Pitanga foi o mais eficiente no controle do crescimento microbiano de Psicrotróficos, visto que nos últimos dias as contagens destas amostras foram as menores ($p < 0,05$). Pode-se considerar que a utilização de concentrações maiores de extratos das folhas desta planta, bem como maiores porcentagens de inclusão destes extratos na carne possam promover maior efeito no controle do crescimento microbiano, de modo a manter essas contagens abaixo de 10^6 para que se garanta a segurança do produto.

Os autores Zhang et al. (2008) reportaram inibição do crescimento de *Pseudomonas* spp. e coliformes totais em carne de porco fresca com adição de extratos combinados de alecrim e *Glycyrrhiza glabra* após 28 dias de estocagem refrigerada.

Utilizando extratos liofilizados de *Satureja hortensis* em carne bovina moída refrigerada ($4 \pm 0,5^\circ\text{C}$) por 3d, Aksu e Özer (2013) observaram que o aumento nas contagens de UFCs nos grupos tratados com adição de 500ppm foi menor que nos grupos controle, tanto para *Pseudomonas* spp. ($4,76 \pm 0,93$ e $5,06 \pm 1,04 \text{Log UFC/g}$, respectivamente), como para psicrotróficos ($5,55 \pm 1,28$ e $5,27 \pm 1,20 \text{Log UFC/g}$, respectivamente).

Similarmente, Allen e Cornforth (2010) obtiveram contagens microbianas abaixo de 10^7 UFC/g em placas Petrifilm 3M para aeróbicos em amostras de carne bovina moída utilizando ácido rosmarínico e eugenol durante estocagem refrigerada por 14 dias.

7.3 Análises Sensorial da Carne Moída com Extratos Vegetais

Diferentemente do que foi realizado no experimento de estabilidade da carne moída com extratos, em que o período amostral foi de 6 dias, optou-se pela redução do período de prateleira para esta etapa após a constatação de que a ocorrência de *off-odor* da carne foi bastante intensa logo após o segundo dia do período amostral. Desse modo, os provadores puderam realizar as análises sensoriais com maior conforto, sem ter que se submeter ao odor desagradável de amostras deterioradas.

As análises estatísticas do teste de ordenação de preferência relativas à cor da carne moída (Tabela 22) revelaram, de modo geral, que ao longo do período amostral de 4 dias os provadores expressaram maior ($p<0,05$) preferência pelas amostras acrescidas de extrato de alecrim nos dias 0 (0,5mL/100g) e 3 (0,1 mL/100g). Além disso, houve também maior ($p<0,05$) preferência pelas amostras sem adição de extrato (controle) nos dias 2 e 4. Em nenhum dos pontos amostrais houve maior ($p<0,05$) preferência pelas amostras com adição de extrato de pitanga.

Tabela 22 – Totais das somas do teste de ordenação de preferência da cor da carne bovina *in natura* com extratos de pitanga (*Eugenia uniflora* L) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*).

Amostra	Dia 0	Dia 2	Dia 3	Dia 4
Pitanga 1	320 ^{ab}	422 ^a	320 ^b	336 ^a
Pitanga 2	356 ^a	357 ^b	381 ^a	334 ^{ab}
Alecrim 1	290 ^b	267 ^c	175 ^c	281 ^b
Alecrim 2	229 ^c	259 ^c	299 ^b	320 ^{ab}
Controle	305 ^{ab}	195 ^d	325 ^{ab}	202 ^c

Fonte: Própria autoria. Pitanga/Alecrim 1 e 2: amostras acrescidas de 0,1 e 0,5mL de extrato/100g de carne, respectivamente. ^{a-d}Valores seguidos por letras diferentes em uma mesma coluna diferem entre si pelo teste de Friedman ao nível de 5% de significância.

O esperado para as análises de cor era a prevalência de apenas um dos tratamentos ao longo dos dias de estocagem como o mais preferido, em que a coloração da carne se apresentasse mais próxima ao vermelho intenso, que é a cor associada a alta qualidade de carne bovina *in natura*; porém tal resultado não foi observado. Ao contrário disso, nenhum dos tratamentos testados apresentou prevalência sobre os demais durante o período amostral. Uma vez que a preferência detectada nos ensaios sensoriais foi pontual, é possível inferir que a adição dos extratos vegetais à carne moída não interferiu na preferência dos provadores ao longo do tempo. Além disso, a adição dos extratos na carne moída nem mesmo causou a rejeição das amostras em relação à cor das mesmas, já que nenhuma delas foi tão pouco classificada como a menos preferida ($p < 0,05$) durante todos os pontos amostrais do período.

A não prevalência de um dos tratamentos sobre os demais quanto a preferência da cor da carne moída ao longo do tempo pode estar associada à interferência da coloração própria dos extratos vegetais, geralmente esverdeada, como foi reportado por Kim, Cho e Han (2013). A presença de pigmentos, como os carotenoides, os taninos e as clorofilas (YANG et al., 1998) podem interferir fortemente na cor dos extratos, que geralmente possuem coloração esverdeada. É importante também ressaltar que alguns pigmentos comumente encontrados em espécies vegetais, como a clorofila, possuem ação pró-oxidante na presença de luz, atuando através do mecanismo de fotoxidação (RAMALHO; JORGE, 2006). Durante o mecanismo supramencionado, uma molécula fotossensibilizadora, na presença de radiação luminosa e oxigênio, pode absorver energia e transferi-la a uma molécula de oxigênio, gerando uma espécie reativa denominada oxigênio singlete (BERGER; HAMILTON, 1995). Essa espécie reativa de oxigênio pode reagir com a proteína mioglobina, responsável pela coloração característica da carne bovina e ocasionar sua oxidação, possibilitando a produção da metamioglobina, cuja

coloração é amarronzada. Similarmente ao que foi observado neste estudo, os autores Kim, Cho e Han (2013) também não observaram um padrão consistente na estabilidade da cor instrumental de carne bovina crua após a adição de extratos vegetais. Em um estudo bastante parecido, Kim et al. (2013) reportam que a adição dos extratos vegetais à carne bovina crua moída foi eficaz na estabilidade lipídica, mas não para promover a manutenção da cor vermelha intensa.

Além das possíveis razões para a ausência de prevalência de um dos tratamentos sobre os demais na preferência de cor citadas acima, há também o fato de que a sensibilidade do olho humano seja muito pequena e incapaz de perceber sutis diferenças de coloração.

Diferentemente do que foi observado para as análises de cor, as análises estatísticas do teste de ordenação de preferência relativas ao odor da carne moída (Tabela 23) revelam que não houve diferença significativa quanto a preferência dos consumidores em relação às amostras. Em outras palavras, nenhuma das amostras foi isoladamente a mais preferida ($p < 0,05$) ao longo do período amostral em relação ao odor, nem mesmo de maneira pontual como ocorreu nas análises de cor. Ao analisar o campo “observações” nas fichas de avaliação dos provadores, constatou-se que há diferenças quanto às preferências pessoais para o atributo odor, pois alguns provadores demonstraram certa rejeição às amostras com extratos, por estas não apresentarem o odor característico da carne. Por outro lado, alguns provadores descreveram preferir as amostras com extratos, justamente por perceberem um odor diferente daquele típico de carne bovina crua.

Tabela 23 – Totais das somas do teste de ordenação de preferência do odor da carne bovina *in natura* com extratos pitanga (*Eugenia uniflora* L) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*).

Amostra	Dia 0	Dia 2	Dia 3	Dia 4
Pitanga 1	299 ^a	363 ^a	305 ^{abc}	335 ^{ab}
Pitanga 2	270 ^a	299 ^b	330 ^{ab}	267 ^c
Alecrim 1	316 ^a	279 ^b	253 ^c	268 ^c
Alecrim 2	298 ^a	277 ^b	274 ^{bc}	281 ^{bc}
Controle	317 ^a	282 ^b	338 ^a	349 ^a

Pitanga/Alecrim 1 e 2: amostras acrescidas de 0,1 e 0,5mL de extrato/100g de carne, respectivamente.

^{a-c}Valores seguidos por letras diferentes em uma mesma coluna diferem entre si pelo teste de Friedman ao nível de 5% de significância.

Durante o segundo dia do período amostral foi observado que tanto para as análises sensoriais relativas ao odor como para as análises de cor, as amostras de carne acrescidas de extrato de pitanga na concentração de 0,1mL/100g expressaram a menor ($p < 0,05$) preferência por parte dos provadores. Este fato pode estar relacionado a uma possível contaminação bacteriana das amostras desse tratamento devido à manipulação da carne. Uma vez que para cada ponto amostral foi utilizada matéria prima diferente e todos os procedimentos de incorporação dos extratos foram realizados, esse fato pode não ter ocorrido nos demais dias do período de estocagem.

8. CONCLUSÕES

O efeito da adição de extratos aquosos de pitanga (*Eugenia uniflora* L.), guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) na estabilidade da carne bovina moída refrigerada foi avaliado na presente tese.

Desse modo, conclui-se que nas condições estudadas:

- Os extratos vegetais de plantas nativas brasileiras, guaraná e pitanga, apresentaram melhor capacidade antioxidante que os de extratos de alecrim;
- Os extratos de pitanga promoveram a inibição do crescimento tanto das bactérias gram positivas como das gram negativas testadas;
- Os extratos de pitanga promoveram melhor estabilidade na oxidação de lipídios da carne bovina moída refrigerada em relação às amostras sem adição de extratos, além de ter apresentado melhor ação antimicrobiana para bactérias psicrotróficas presentes na carne pelo período de 6 dias.
- A adição de extratos aquosos de pitanga e alecrim à carne bovina moída *in natura* refrigerada não interferiu na preferência dos atributos de cor e odor por parte dos provadores, e ainda, que o atributo odor parece estar associado à preferências pessoais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBAJO, A. C.; OLOKE, K. J.; ALADESANMI, A. J. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. **Fitoterapia**. Amsterdam, v. 60, n. 5, p. 451–455, 1989.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961**. Dispõe sobre Normas Técnicas Especiais Reguladoras do Emprego de Aditivos Químicos a Alimentos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/50040_61.htm. Acesso em: 05/04/2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 267, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o Regulamento técnico de espécies vegetais para o preparo de chás. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e2ad670047457e3d8a4ade3fbc4c6735/RDC_267_2005.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 18/04/2015.

AGUILERA, J. M. Food product engineering: building the right structures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Chichester, v. 86, n. 8, p. 1147-1155, jun 2006.

AKSU, M. I.; ÖZER, H. Effects of lyophilized water extract of *Satureja hortensis* on the shelf life and quality properties of ground beef. **Journal of Food Processing and Preservation**. Hoboken, v. 37, n. 5, p. 777–783, 2013.

ALLEN, K.; CORNFORTH, D. Comparison of spice-derived antioxidants and metal chelators on fresh beef color stability. **Meat Science**. Amsterdam, v. 85, n. 4, p. 613-9, ago 2010.

ALMELA, L. et al. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. **Journal of chromatography A**. Amsterdam, v. 1120, n. 1-2, p. 221–229, 7 jul. 2006.

ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**. São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1224–1229, 2008.

AMANY, M. M. B.; SHAKER, M. A.; ABEER, A. K. Antioxidant activities of date pits in a model meat system. **International Food Research Journal**. Selangor, v. 19, n. 1, p. 223–227, 2012.

AMORIM, A. C. L. et al. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**. Muenchen, v. 16, n. 10, p. 923–928, out. 2009.

ANDRÉS-BELLO, A. et al. Effect of pH on Color and Texture of Food Products. **Food Engineering Reviews**. New York, v. 5, n. 3, p. 158-170, 9 maio 2013.

ANESINI, C. et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT - Food Science and Technology**. Camden, v. 45, n. 2, p. 299-304, mar 2012.

ASSOCIATION of OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis 956.01**, 16 ed. Washington DC: AOAC, 1996. cap. 3, p.10.

ASSOCIATION of OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis 990.12**, 19 ed. Washington DC: AOAC, 2012. cap. 17.

ASSOCIATION of OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis 2003.11**, 19 ed. Washington DC: AOAC, 2012.

ARGOTI, J. C. et al. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of a selection of wild-growing Colombian plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Chichester, v. 91, n. 13, p. 2399-2406, out 2011.

AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 62, n. 1, p. 55-61, 2003.

BAILEY, A. E. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 5. ed. New York: John Wiley, 1996.

BARON, C. P.; ANDERSEN, H. J. Myoglobin-Induced Lipid Oxidation . A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v. 50, p. 3887-3897, 2002.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 1986.

BASILE, A. et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**. Shannon, v. 102, n. 1, p. 32-36, 31 out 2005.

BELL, R. G. Meat Packaging : Protection , Preservation , and Presentation. In: HUI, Y. H. et al. (Eds.). **Meat Science and Applications**. New York: Marcel Dekker Inc., 2001. cap. 19.

BERGER, K. G.; HAMILTON, R. J. **Developments in oils and fats**. 1. ed. London: Springer, 1995.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRANNAN, R. G.; MAH, E. Grape seed extract inhibits lipid oxidation in muscle from different species during refrigerated and frozen storage and oxidation catalyzed by

peroxynitrite and iron/ascorbate in a pyrogallol red model system. **Meat science**. Amsterdam, v. 77, n. 4, p. 540–546, dez. 2007.

BRASIL. Instrução Normativa nº51 de 29 de dezembro de 2006. Adota o Regulamento Técnico de Atribuição de Aditivos, e seus Limites das seguintes Categorias de Alimentos 8: Carne e Produtos Cárneos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 04 jan. 2007. Seção 1, p. 14.

CAMO, J. et al. Display life of beef packaged with an antioxidant active film as a function of the concentration of oregano extract. **Meat Science**. Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 174-8, maio 2011.

CAMPOS, F. M.; SABARENSE, C. M.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Revista de Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v.19, n.4, p. 481-490, out./dez. 2008

CARLEZ, A.; VECIANA-NOGUES, T.; CHEFTEL, J. C. Changes in colour and myoglobin of minced beef meat due to high pressure processing. **Food Science and Technology**. London, v. 28, p. 528-538, 1995.

CATANIA, A. S.; BARROS, C. R. DE; FERREIRA, S. R. G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. São Paulo, vol.53 nº5, p. 550-559, jul. 2009.

CHAIJAN, M. Review: Lipid and myoglobin oxidations in muscle foods. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. Hat Yai, v. 30, n. 1, p. 47-53, 2008.

CHAN, W. K. et al. Dietary vitamin E effect on color stability and sensory assessment of spoilage in three beef muscles. **Meat Science**. Amsterdam, v. 42, n. 4, p. 387-99, abr 1996.

CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A. N.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**. Shannon, v. 66, n. 1, p. 33–39, jul. 1999.

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacology**. Shannon, v. 81, p. 57-63, 2002.

CORNFORTH, D. Colour– its basis and importance. In: PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R. (ed). **Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish product** – Advances in meat research series. New York: Chapman and Hall, 1994. cap.2, p. 34–78.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. A importância das famílias Myrtaceae e Melastomataceae na etnomedicina brasileira. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. Havana, v. 10, n. 5, 2005.

DALONSO, N.; PETKOWICZ, C. L. O. Guarana powder polysaccharides: characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic fraction. **Food chemistry**. Amsterdam, v. 134, n. 4, p. 1804–1812, 15 out. 2012.

DECKER, E. C.; FAUSTMAN, C.; LOPEZ-BOTE, C. J. **Antioxidants in Muscle Foods**. 1. ed. New York: John Wiley & Sons, 2000. p. 512

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DELGADO-ADÁMEZ, J. et al. In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). **Food Control**. Kidlington, v. 24, n. 1-2, p. 136–141, mar. 2012.

DESCALZO, A. M. et al. Antioxidant status and odour profile in fresh beef from pasture or grain-fed cattle. **Meat Science**. Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 309–317, 2007.

DJENANE, D. et al. Extension of the shelf life of beef steaks packaged in a modified atmosphere by treatment with rosemary and displayed under UV-free lighting. **Meat Science**. Amsterdam, v. 64, n. 4, p. 417-426, ago 2003.

DUARTE, S. et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological & pharmaceutical bulletin**. Tokyo, v. 26, n. 4, p. 527–31, abr. 2003.

ESMER, K. O. et al. The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. **Meat Science**. Amsterdam, v. 88, n. 2, p. 221-226, 2011.

ESTÉVEZ, M.; VENTANAS, S.; CAVA, R. Oxidation of lipids and proteins in frankfurters with different fatty acid compositions and tocopherol and phenolic contents. **Food Chemistry**. Amsterdam, v. 100, n. 1, p. 55-63, jan 2007.

FASSEAS, M. K. et al. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 1188-1194, fev 2008.

FAUSTMAN, C. et al. Myoglobin and lipid oxidation interactions: mechanistic bases and control. **Meat Science**. Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 86-94, set 2010.

FAUSTMAN, C.; CASSENS, R. G. The effect of cattle breed and muscle type on discoloration and various biochemical parameters in fresh beef. **Journal of Animal Science**. Champaign, v. 69, p. 184–193, 1991.

FAUSTMAN, C.; WANG, K.W. Potential mechanisms by which vitamin E improves Oxidative stability of Myoglobin. In: DECKER, E. C.; FAUSTMAN, CAMERON; LOPEZ-BOTE, C. J. (Eds.). **Antioxidants in Muscle Foods**. New York: John Wiley & Sons, 2000. p. 135-152.

FERREIRA, V. L. P. et al. **Análise sensorial: Testes discriminativos e afetivos**. 1 ed. Campinas: SBCTA PROFQUA, 2000.

FLAMINI, G. et al. Main agronomic-productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v. 50, p. 3512-3517, 2002.

FUKUMASU, H. et al. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guarana, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**. Shannon, v. 233, p. 158–164, 2006.

GARMUS, T. T. et al. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**. Amsterdam, v. 86, p. 4–14, fev. 2014.

GIBIS, M.; WEISS, J. Antioxidant capacity and inhibitory effect of grape seed and rosemary extract in marinades on the formation of heterocyclic amines in fried beef patties. **Food chemistry**. Amsterdam, v. 134, n. 2, p. 766–774, 15 set. 2012.

GILL, C. Extending the Storage Life of Raw Chilled Meats. **Meat Science**. Amsterdam, v. 43, p. 99-109, 1996.

GOH, L. M.; BARLOW, P. J.; YONG, C. S. Examination of antioxidant activity of *Ginkgo biloba* leaf infusions. **Food Chemistry**. Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 275–282, ago. 2003.

GOMIDE, L. A. M.; RAMOS, E. M.; FONTES, P. R. **Tecnologia de Abates e tipificação de carcaças**. Viçosa: UFV, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HAMERSKI, L.; SOMNER, G. V.; TAMAIO, N. *Paullinia cupana* Kunth (Sapindaceae): A review of its ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Medicinal Plants Research**. Ma'an, v. 7, n. 30, p. 2221–2229, 2013.

HAMILTON, R. J. **Developments in oils and fats**. 1 ed. London: Springer, 1995.

HOSSAIN, M. B. et al. Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify different spices based on in vitro antioxidant activity and individual polyphenolic antioxidant compounds. **Journal of Functional Foods**. Amsterdam, v. 3, n. 3, p. 179-189, jul 2011.

HOYLE PARKS, A. R. et al. Spoilage characteristics of ground beef with added lactic acid bacteria and rosemary oleoresin packaged in a modified-atmosphere package and displayed at abusive temperatures. **Journal of Animal Science**. Champaign, v. 90, p. 2054-2060, 2012.

HUANG, B. et al. Antioxidant activity of bovine and porcine meat treated with extracts from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot and leaf. **Meat science**. Amsterdam, v. 87, n. 1, p. 46–53, jan. 2011.

INSANI, E. M. et al. Oxidative stability and its relationship with natural antioxidants during refrigerated retail display of beef produced in Argentina. **Meat Science**. Amsterdam, v. 79, n. 3, p. 444-452, jul 2008.

ISMAIL, H. A. et al. Effect of antioxidant application methods on the color, lipid oxidation, and volatiles of irradiated ground beef. **Journal of Food Science**. Hoboken, v. 74, n. 1, p. C25-32, 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 13720:2010**: Meat and meat products — Enumeration of presumptive *Pseudomonas* spp. Geneva, 2010.

JOHNSTON, C. S.; STEINBERG, F. M.; RUCKER, R. B. Ascorbic Acid. In: ZEMPLIENI, J.; RUCKER, R. B. .; MCCORMICK, D. B.; SUTTIE, J. W. (Eds.). **Handbook of Vitamins**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 489-520.

KARRE, L.; LOPEZ, K.; GETTY, K. J. K. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat science**. Amsterdam, v. 94, n. 2, p. 220–227, jun. 2013.

KIM, S.J. et al. Evaluation of the antioxidant activities and nutritional properties of ten edible plant extracts and their application to fresh ground beef. **Meat science**, Amsterdam, v. 93, n. 3, p. 715–22, mar. 2013

KIM, S.J.; CHO, A. R.; HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. **Food Control**. Kidlington, v. 29, n. 1, p. 112–120, jan. 2013.

KIM, Y. H. et al. Evaluation of antioxidant capacity and colour stability of calcium lactate enhancement on fresh beef under highly oxidising conditions. **Food Chemistry**. Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 272-278, 2009.

KIM, Y. H. et al. High-oxygen modified atmosphere packaging system induces lipid and myoglobin oxidation and protein polymerization. **Meat Science**. Amsterdam, v. 85, n. 4, p. 759-767, 2010.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**. New York, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

KONCZAK, I. et al. Antioxidant capacity and phenolic compounds in commercially grown native Australian herbs and spices. **Food Chemistry**. Amsterdam, v. 122, n. 1, p. 260-266, set 2010.

KONG, B.; ZHANG, H.; XIONG, Y. L. Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action. **Meat Science**. Amsterdam, v. 85, n. 4, p. 772-8, ago 2010.

KORNSTEINER, M.; WAGNER, K.-H.; ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. **Food Chemistry**. Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 381-387, jan 2006.

KRINSKY, N. I. The Antioxidant and Biological Properties of the Carotenoids. In: ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCE, 1998, New York. **Anais eletrônicos...** New York: Wiley Online Publications, 1998. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09923.x/epdf>. Acesso em: 10/06/2014.

KRZYWICKI, K. Assessment of relative content of myoglobin, oxymyoglobin and metmyoglobin at the surface of beef meat. **Meat Science**. Amsterdam, v. 3, p. 1-10, 1979.

LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica : mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. São Paulo, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIU, F. et al. Optimizing color and lipid stability of beef patties with a mixture design incorporating with tea catechins, carnosine, and α -tocopherol. **Journal of Food Engineering**. London, v. 98, n. 2, p. 170-177, maio 2010.

LU, M. et al. Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. **Food Research International**. Kidlington, v. 44, n. 2, p. 530-536, mar 2011.

LUND, M. N. et al. Protein oxidation in muscle foods : A review. **Molecular Nutrition and Food Research**. Weinheim, v. 55, p. 83-95, 2011.

LUND, M. N.; HVIID, M. S.; SKIBSTED, L. H. The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. **Meat Science**. Amsterdam, v. 76, p. 226-233, 2007.

LYNCH, M. P. et al. Effect of dietary vitamin E supplementation on the colour and lipid stability of fresh, frozen and vacuum-packaged beef. **Meat Science**. Amsterdam, v. 52, n. 1, p. 95-9, maio 1999.

MAJHENIČ, L.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Ž. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**. Amsterdam, v. 104, n. 3, p. 1258-1268, jan 2007.

MARSHALL, D. L.; BAL'A, M. F. A. Microbiology of Meats. In: HUI, Y. H. et al. (Eds.). **Meat Science and Applications**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001. cap. 7.

MARTIN, J. G. P. et al. Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes. **Journal of Natural Products**. Washington, v. 5, p. 27-36, 2012.

MARTINEZ-CORREA, H. A. et al. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**. Amsterdam, v. 55, n. 3, p. 998-1006, jan. 2011.

MARTINS, C. D. A. **Avaliação da Atividade Antioxidante in vitro e in vivo do Guaraná (*Paullinia cupana*) em pó**. 2010. 130 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MATSUMURA, T. et al. Alfa-glucosidase inhibitors from Paraguayan natural medicine, Nangapiry, the leaves of *Eugenia uniflora* L. **Pharmaceutical Biology**. London, v. 38, p. 302-307, 2000.

MC CARTHY, T. L. et al. Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. **Meat Science**. Amsterdam, v. 57, n. 1, p. 45-52, maio 2001.

MCMILLIN, K. W. Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. **Meat Science**. Amsterdam, v. 80, p. 43-65, 2008.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**. 3. ed. New York: CRC Press, 1999.

MONAHAN, F. J. Oxidation of lipids in muscle foods: fundamental and applied concerns. In: DECKER, E. C.; FAUSTMAN, CAMERON; LOPEZ-BOTE, C. J. (Eds.). **Antioxidants in Muscle Foods**. New York: John Wiley & Sons, 2000. p. 3-23.

MORÁN, L. et al. Meat texture and antioxidant status are improved when carnosic acid is included in the diet of fattening lambs. **Meat Science**. Amsterdam, v. 91, n. 4, p. 430-4, ago 2012.

NAGY, T. O. et al. Identification of phenolic components in dried spices and influence of irradiation. **Food Chemistry**. Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 530-534, set 2011.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Approved Standard. NCCLS document M7-A6. Wayne: NCCLS, 2003.

NELSON, K. A.; LABUZA, T. P. Relationship Between Water and Lipid Oxidation Rates - Water Activity and Glass Transition Theory. In: ANGELO, A. J. ST. (Ed.). **Lipid Oxidation in Food**. Washington, D.C.: American Chemical Society, 2009. p. 93-103.

NEWELL, G. J.; MACFARLANE, J. D. Expanded Tables for Multiple Comparison Procedures in the Analysis of Ranked Data. **Journal of Food Science**. Hoboken, v. 52, n. 6, p. 1721-1725, 1987.

NYCHAS, G. J. E. et al. Meat spoilage during distribution. **Meat science**. Amsterdam, v. 78, n. 1-2, p. 77-89, jan. 2008.

OGUNWANDE, I. A. et al. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **International Journal of Aromatherapy**. La Martre, v. 15, n. 3, p. 147-152, 2005.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**. São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLSON, O.E. et al. Modification of the official Fluorimetric method for selenium in plants. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**. Rockville, v.58, p.117-121, 1975.

- OTHMAN, M. et al. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**. Amsterdam, v. 84, n. 2, p. 161–166, fev. 2011.
- ÖZCAN, M. M.; ARSLAN, D. Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. **Food Chemistry**. Amsterdam, v. 129, n. 1, p. 171–174, nov 2011.
- PAIVA, S. A. R.; RUSSELL, R. M. Beta-Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. **Journal of the American College of Nutrition**. Clearwater, v. 18, n. 5, p. 426-433, 1999.
- PASTSART, U. et al. Effect of muscle and post-mortem rate of pH and temperature fall on antioxidant enzyme activities in beef. **Meat science**. Amsterdam, v. 93, n. 3, p. 681–6, mar. 2013.
- PEARSON, A. M. et al. Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. **Food Technology**. Chicago, v. 37, n. 7, p. 121-129, 1983.
- PHILLIPS, A. L. et al. Effect of dietary alfa-tocopherol supplementation on color and lipid stability in pork. **Meat Science**. Amsterdam, v. 58, p. 389-393, 2001.
- POLAT, U.; YESILBAG, D.; EREN, M. Serum Biochemical Profile of Broiler Chickens Fed Diets Containing Rosemary and Rosemary Volatile Oil. **Journal of Biological & Environmental Sciences**. Görükle, v. 5, n. 13, p. 23–30, 2011.
- PRASAD, A. S. et al. Antioxidant effect of zinc in humans. **Free radical biology & medicine**. Philadelphia, v. 37, n. 8, p. 1182–1190, 15 out. 2004.
- RAMALHO, C. V.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**. São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical. **Free Radical Biology & Medicine**. Philadelphia, v. 26, n. 98, p. 1231-1237, 1999.
- RENERRE, M. Oxidative Process and Myoglobin. In: DECKER, E. C.; FAUSTMAN, CAMERON; LOPEZ-BOTE, C. J. (Eds.). **Antioxidants in Muscle Foods**. New York: John Wiley & Sons, 2000. p. 113-133.
- RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH⁺**. Fortaleza: EMBRAPA, 2007. Comunicado Técnico da Embrapa 127.
- SAENZ-LOPEZ, R.; FERNANDEZ-ZURBANO, P.; TENA, M. T. Capillary electrophoretic separation of phenolic diterpenes from rosemary. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v. 953, n. 1-2, p. 251-256, 2002.
- SÁNCHEZ-ESCALANTE, A. et al. Antioxidant Action of Borage, Rosemary, Oregano, and Ascorbic Acid in Beef Patties. **Journal of Food Science**. Hoboken, v. 68, n. 1, p. 339-344, 2003.

SANTOS, K. K. A. et al. Anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Experimental parasitology**. Maryland Heights, v. 131, n. 1, p. 130–132, maio 2012.

SCHAPOVAL, E. E. S. et al. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of e Ethnopharmacology**. Shannon, v. 44, p. 137–142, 1994.

SCHMEDA-HIRSCMANN, G. et al. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**. Shannon, v. 21, p. 183–186, 1987.

SERPEN, A.; GÖKMEN, V.; FOGLIANO, V. Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. **Meat Science**. Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 60-65, jan 2012.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. New York, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHAN, B. et al. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v. 53, n. 20, p. 7749-7759, 5 out 2005.

SHERWIN, C. P.; LABUZA, T. P. Beyond Water Activity and Glass Transition: A Broad Perspective on the Manner by which Water Can Influence Reaction Rates in Foods. In: BUERA, M. DEL P. et al. (Eds.). **Water Properties of Food, Pharmaceutical, and Biological Materials**. Boca Raton: CRC Press 2006, p. 343–371.

SIEDEMANN, J. Guarana (*Paullinia cupana* HB. K.) - an active agent from the tropical rain-forest. **Der Tropenlandwirt**. Witzenhausen, v. 99, p. 49-63, 1998.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. DE. **Análise de Alimentos: Métodos Químicos e Biológicos**. 3 ed. Viçosa: Editora UFV, 2006.

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**. São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Minerais por espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)**. In: Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal. CAPUTI, B. (coord.) Igil Ind. Gráfica Ltda., Itu, SP: SINDIRAÇÕES, São Paulo, 2013, p. 175-180.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substances and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**. Maryland Heights, v. 299, p. 152-179, 1999.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rn/v15n1/a08v15n1.pdf> Acesso em: 02/03/2013.

SOBRAL, M. et al. **Myrtaceae**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB010560>.> Acesso em: 15 jan. 2013.

SORENSEN, G.; JORGENSEN, S. S. A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products. **Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung**. Heidelberg, v. 202, n. 3, p. 205-210, 1996.

SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A.; FERRI, P. H. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**. Rio de Janeiro, v. 33, p. 247-249, 2002.

STETZER, A. J.; NOVAKOFSKI, J. E.; BREWER, M. S. A Research Note: Effect of Citric Acid and/or Rosemary Extract on Color of an Irradiated Beef Myoglobin Model System. **Journal of Muscle Foods**. Hoboken, v. 20, p. 28-36, 2009.

SUN, Q. et al. Effect of Water Activity on Lipid Oxidation and Protein Solubility in Freeze-dried Beef during Storage. **Journal of Food Science**. Hoboken, v. 67, p. 2512–2516, 2002.

SUPERINTENDÊNCIA DA ZONA FRANCA DE MANAUS (SUFRAMA). Projeto Potencialidades regionais Estudo de Viabilidade Econômica. Guaraná. Julho 2003. Disponível em: http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj_pot_regionais/guarana.pdf Acesso em: 20/05/2012.

SVOBODA, K. P.; DEANS, S. G. No TitleA study of the variability of rosemary and sage and their volatile oils on the British market: their antioxidant properties. **Flavour and Fragrance Journal**. Chichester, v. 7, n. 2, p. 81-87, 1992.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**. Kidlington, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, set 2010.

TANG, J.; FAUSTMAN, C.; HOAGLAND, T. A. Krzywicki revisited: equations for spectrophotometric determination of myoglobin redox forms in aqueous meat extracts. **Journal of Food Science**. Hoboken, v. 69, n. 9, p. 717-720, 2004.

THORSEN, M. A.; HILDEBRANDT, K. S. Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts - Aspects of accurate quantification. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v. 995, n. 1-2, p. 119-125, 2003.

TORRIERI, E. et al. Effect of modified atmosphere and active packaging on the shelf-life of fresh bluefin tuna fillets. **Journal of Food Engineering**. London, v. 105, n. 3, p. 429-435, ago 2011.

TRABER, M. G. Vitamin E. In: ZEMPLIENI, J.; RUCKER, R. B. ; MCCORMICK, D. B.; SUTTIE, J. W. (Eds.). **Handbook of Vitamins**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 153-174.

TROY, D. J.; KERRY, J. P. Consumer perception and the role of science in the meat industry. **Meat Science**. Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 214-26, set 2010.

UENOJO, M.; MÁRIO ROBERTO, M. J.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação de compostos de aroma. **Química Nova**. São Paulo, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

VALERIANO, C. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Paulínia, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.

VASAVADA, M. N.; DWIVEDI, S.; CORNFORTH, D. Evaluation of Garam Masala Spices and Phosphates as Antioxidants in Cooked Ground Beef. **Journal of Food Science**. Hoboken, v. 71, n. 5, p. C292-C297, jun 2006.

VELASCO, V.; WILLIAMS, P. Improving meat quality through natural antioxidants. **Chilean Journal of Agricultural Research**. Chillan, v. 71, n. 2, p. 313-322, 2011.

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**. Oxford, v. 50, n. 8, p. 2668-2674, ago. 2012.

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

_____. Evaluation of direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L.). **Fette Seifen Anstrichmittel**. Weinheim, v. 77, n. 6, p. 239-240, 1975.

WATERHOUSE, A. L. Determination of Total Phenolics. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2002. p. 1-8.

WIJNGAARD, H. et al. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. **Food Research International**. Kidlington, v. 46, n. 2, p. 505-513, maio 2012.

WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**. Amsterdam, v. 105, n. 3, p. 940-949, 2007.

YANG, C. M. et al. Methods for the Determination of the Chlorophylls and their Derivates. **Taiwania**. Taiwan, v. 43, n. 2, p. 116-122, 1998.

YU, J.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I. Potential of peanut skin phenolic extract as antioxidative and antibacterial agent in cooked and raw ground beef. **International Journal of Food Science and Technology**. West Sussex, v. 45, n. 7, p. 1337–1344, 2010.

ZAKRYS-WALIWANDER, P. I. et al. Sensory comparison of commercial low and high oxygen modified atmosphere packed sirloin beef steaks. **Meat Science**. Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 198-202, maio 2011.

ZHANG, H. et al. Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 degrees C. **Meat science**. Amsterdam, v. 81, p. 686–692, 21 nov. 2008.

ZHOU, G. H.; XU, X. L.; LIU, Y. Preservation technologies for fresh meat - a review. **Meat Science**. Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 119-28, set 2010.

ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Consentimento formal de participação no projeto de pesquisa: "Efeito antioxidante de extratos aquosos de pitanga (*Eugenia uniflora* L.), guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) na estabilidade da cor de carne moída bovina refrigerada".

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ CEP: _____ Fone: _____

Justificativa: Uma vez que o uso de antioxidantes sintéticos para promover a conservação de alimentos tem sido alvo de questionamentos devido a possíveis efeitos tóxicos que estes podem causar, a utilização de substâncias naturais com poder antioxidante mostra-se uma alternativa bastante interessante. No caso da carne bovina *in natura*, a cor é um dos principais atributos, pois a maioria dos consumidores associa esta característica à qualidade do produto no ato da compra.

Objetivos do projeto: avaliar o efeito antioxidante de extratos aquosos de pitanga (*Eugenia uniflora* L.), guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) na estabilidade da cor da carne bovina moída refrigerada.

Procedimentos: A análise onde seres humanos avaliam diversos atributos de qualidade de alimentos é chamada de ANÁLISE SENSORIAL. Os procedimentos para execução da análise sensorial nesta pesquisa serão os seguintes:

- Cem provadores farão a avaliação sensorial dos produtos.
- Serão testadas amostras de carne moída bovina refrigerada acrescidas ou não de extratos vegetais diferentes em duas concentrações.
- O provador deverá avaliar (olhar e cheirar) os produtos e responder às perguntas solicitadas na Ficha de Avaliação.
- A duração do teste para cada pessoa será de aproximadamente 10 minutos.

Outras informações:

- O provador pode se recusar a continuar com a avaliação sensorial a qualquer momento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- Os provadores não terão qualquer tipo de **despesas em decorrência da**

participação nesta pesquisa.

- **Não há possibilidade de risco ou qualquer tipo de desconto** em função da participação nesta pesquisa, uma vez que todos os ingredientes utilizados nos produtos são inteiramente seguros e serão de boa qualidade e procedência.

- Em função do exposto no item anterior, não há **previsão de indenização em decorrência da participação neste projeto.**

- Os testes para avaliação sensorial das amostras de carne, nos quais os provadores avaliarão os produtos desenvolvidos **serão acompanhados** pela aluna proponente (Msc Flávia Carolina Vargas).

- Quaisquer outros esclarecimentos poderão ser solicitados antes, durante e após a pesquisa.

Eu, _____, RG _____, CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo "Efeito antioxidante de extratos aquosos de pitanga (*Eugenia uniflora* L.), guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) na estabilidade da cor de carne moída bovina refrigerada".

Tenho pleno conhecimento da justificativa, objetivos, benefícios esperados e dos procedimentos a serem executados, bem como da possibilidade de receber esclarecimentos sempre que considerar necessário. Será mantido sigilo quanto à identificação de minha pessoa e zelo a minha privacidade. Ao mesmo tempo assumo o compromisso de seguir as recomendações estabelecidas pelos pesquisadores.

Eu li e entendi todas as informações contidas neste documento.

Aluna responsável: Flávia Carolina Vargas – Mestre em Zootecnia

Contato: fla_vargas@yahoo.com

Fone: (19) 3565-4186

Pirassununga, _____ de _____ de _____. Assinatura: _____

ANEXO 2

Fichas para análise sensorial de cor e odor da carne moída (adaptado de FERREIRA et al., 2000).

Provador :..... Nome:..... Data: / / .
<p>Avalie e ordene as amostras codificadas de carne moída BOVINA da esquerda para a direita de acordo com sua preferência, da mais preferida para a menos preferida, em relação à COR das amostras. FAVOR NÃO ALTERAR A ORDEM DE APRESENTAÇÃO DAS AMOSTRAS.</p> <p>1..... 2..... 3..... 4..... 5.....</p>
Comentários:

Provador :..... Nome:..... Data: / / .
<p>Avalie e ordene as amostras codificadas de carne moída BOVINA da esquerda para a direita de acordo com sua preferência, da mais preferida para a menos preferida, em relação ao ODOR das amostras. FAVOR NÃO ALTERAR A ORDEM DE APRESENTAÇÃO DAS AMOSTRAS.</p> <p>OBS: Abra uma amostra por vez. Não inalar mais de uma vez cada amostra. Caso haja necessidade, aguardar alguns instantes entre amostras.</p> <p>1..... 2..... 3..... 4..... 5.....</p>
Comentários: