UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MANOELA ALVES PIRES

Avaliação da capacidade antioxidante de extratos comerciais de alecrim e chá verde e sua influência na estabilidade de hambúrguer de frango durante armazenamento congelado

Pirassununga
2014

MANOELA ALVES PIRES

Avaliação da capacidade antioxidante de extratos comerciais de alecrim e chá verde e sua influência na estabilidade de hambúrguer de frango durante armazenamento congelado

(VERSÃO CORRIGIDA)

Dissertação apresentada a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Trindade

Pirassununga

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

Pires, Manoela Alves
P667a Avaliação da capacidade antioxidante de extratos comerciais de alecrim e chá verde e sua influência na estabilidade de hambúrguer de frango durante armazenamento congelado / Manoela Alves Pires. -- Pirassununga, 2014.
105 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Ciência da Engenharia de Alimentos.
Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Trindade.

1. Antioxidantes 2. Oxidação lipídica 3. BHA 4. DPPH. I. Título.

A meu querido filho Arthur por ser minha inspiração, ao meu esposo André por toda compreensão, ao meu pai Joaquim pela educação dada, a minha mãe Glória por seu amor e aos meus queridos irmãos: Antonia, Matilde, Fátima, Gorete e Luiz, por todo incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me mostrar o caminho de uma "vida com propósitos" e estar sempre ao meu lado.

Ao meu orientador o Prof. Dr. Marco Antonio Trindade, por todo seu conhecimento, paciência, discussões, incentivo e observações necessárias no desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu filho Arthur Alves do Nascimento e meu esposo André Braz do Nascimento, por terem tido a paciência de me ver horas e dias ausentes, ou mesmo perto, muitas vezes em pensamentos distantes.

Ao meu querido pai Joaquim Pires Afonso (in memorian) que mesmo ausente nesse momento me fez relembrar cada olhar de incentivo e orgulho presentes durante minha educação.

A minha querida mãe Maria da Glória Novais Alves Pires, pelo amor e conselhos no meu desenvolvimento profissional.

Aos meus queridos irmãos Antonia, Matilde, Fátima, Gorete e Luiz e também aos meus sobrinhos Désmond, Thabata e Gabriela por acreditarem em mim.

Ao Prof. Dr. Fernando Gustavo Tonin, pela dedicação acadêmica e disponibilidade de enriquecer conhecimento durante o projeto.

A Profa. Dra. Maria Teresa Freire, pela contribuição no uso do laboratório de embalagens.

A minha fiel amiga Maria do Socorro Aureliano da Silva, pela paciência de me ensinar e me orientar durante os doze anos de convivência.

A Adriana Apuzzo, da empresa Dupont Danisco, pelo incentivo e envio das amostras necessárias à elaboração deste trabalho.

Aos meus colegas de pós-graduação, que entre um experimento e outro me ajudaram em diversos momentos.

Aos inúmeros e prestativos estagiários: Paulo, Ana Maria, Merícia, Thais, Caio, Niara, Juliana, Beatriz, Thiago

Aos técnicos e especialistas de laboratório da Engenharia de Alimentos, pelo apoio nos laboratórios durante todo desenvolvimento dos experimentos.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Academia da Força Aérea, pela oportunidade de realizar parte deste trabalho dentro de sua unidade.

Aos cadetes da Academia da Força Aérea e meus colegas de trabalho, pela dedicação em realizar os testes sensoriais.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Há momentos na vida que custam a passar, mas que deixam na alma um sabor doce por saber que, apesar de difíceis, existem e podem ser vividos, e que por não nos matarem nos tornam mais fortes! São esses momentos que nos fazem sentir preenchidos e cheios de vontade de correr e ir mais além, lutando sempre e sem olhar para trás, porque o futuro pertence-nos e será aquilo que dele quisermos fazer. O destino surpreende-nos, põe-nos à prova, mas dá-nos sempre um reverso da medalha que por si só faz com que Tudo, mesmo Tudo, valha a pena!”

Autor desconhecido

RESUMO

PIRES, M. A. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos comerciais de alecrim e chá verde e sua influência na estabilidade de hambúrguer de frango durante armazenamento congelado.** 2014. 105 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

A atividade antioxidante de dois extratos comerciais de alecrim e chá verde foi comparada com a atividade do sintético BHA para substituição total do sintético em hambúrguer de frango. A quantificação foi determinada pelos métodos Folin-Ciocalteau, FRAP e DPPH. De acordo com as análises de atividade antioxidante, as dosagens dos extratos naturais foram determinadas, utilizando-se como base o limite de dosagem do BHA (0,01% base gordura) e aplicadas em hambúrgueres de frango: T1: Controle; T2: 0,002% BHA; T3: 0,0038% Chá Verde; T4: 0,001% Chá Verde; T5: 0,048% Alecrim; T6: 0,00186% Alecrim. Foram realizadas análises de composição centesimal e pH e análises de estabilidade no armazenamento congelado: rendimento e redução do diâmetro, índice de TBARs, cor objetiva (parâmetros L*, a* e b*) e teste sensorial de aceitação. No método Folin-Ciocalteau, das análises de atividade antioxidante, o BHA não apresentou diferença com o chá verde ($p > 0,05$), no método FRAP o melhor ($p < 0,05$) desempenho foi do BHA e no DPPH o chá verde apresentou maior atividade ($p < 0,05$). Os resultados de TBARS, nos hambúrgueres, mostraram diferença significativa entre as amostras e também interação amostras x tempo do armazenamento ($p < 0,05$), sendo que após 120 dias o teste com maior dosagem do extrato de alecrim (T5) não diferiu do sintético (T2) (0,423 e 0,369 índice de TBARs, respectivamente). No aspecto sensorial as amostras não diferiram entre si ($p>0,05$) nem durante todo o período de armazenamento ($p > 0,05$). Dentro das condições experimentais pode-se afirmar que o extrato comercial de alecrim pode substituir totalmente o antioxidante BHA em hambúrguer de frango, garantindo a mesma estabilidade oxidativa e sem interferir em sua aceitação sensorial.

Palavras chave: antioxidantes, oxidação lipídica, BHA, poder e atividade antioxidante, DPPH.

ABSTRACT

PIRES, M. A. **Antioxidant activity evaluation of commercial extracts of rosemary and green tea and its influence on the stability of chicken burger during frozen storage.** 2014. 105 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

The antioxidant activity of two commercial extracts, rosemary and green tea, were compared with the activity of the synthetic BHA for total replacement of the synthetic in chicken burger. The spectrometric quantification was determined by UV - VIS methods: Folin - Ciocalteu , FRAP and DPPH . In the Folin-Ciocalteau method the BHA showed no difference with green tea ($p > 0.05$), in the FRAP method the BHA obtained better ($p < 0.05$) performance and for DPPH the green tea showed greater activity ($p < 0.05$). According to the analysis of antioxidant activity, dosages of natural extracts were determined, using as basis the limit dosage of BHA (0.01 % fat base) and applied in chicken burgers: T1: Control, T2: 0.002 % BHA, T3: 0.0038 % Green Tea, T4: 0.001 % Green Tea, T5: 0.048 % Rosemary and T6: 0.00186 % Rosemary. Chemical-physical analysis of chemical composition and pH were made, and also stability analysis: cooking loss and reducing the diameter, TBARs index, objective color (parameters L *, a * and b *) and sensory acceptance test. The results of TBARS showed a significant difference between samples and also samples interaction x storage time ($p < 0.05$), after 120 days the test with higher dosage of rosemary extract (T5) did not differ from synthetic (T2) (0.423 and 0.369 TBARS index, respectively), thus better performance than the other tests. The sensory evaluation results showed that the samples did not differ during the storage period ($p > 0.05$). According the experimental conditions can be concluded that the commercial rosemary extract can completely replace the antioxidant BHA.

Keywords: antioxidants, lipid oxidation, BHA, powder and antioxidant activity, DPPH.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Características importantes na avaliação da carne de frango. 5
Figura 2 – Esquema geral do mecanismo da autoxidação. 9
Figura 3 – Formas da mioglobina em carnes.. 13
Figura 4 - Reação de TBA com MDA e formação do complexo avermelhado. 18
Figura 5 – Mecanismo de ação dos antioxidantes primários. 21
Figura 6 – Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos.. 24
Figura 7 – Estrutura química dos principais componentes do extrato de alecrim. 28
Figura 8 – Conversão do ácido carnósico em carnosol e subsequentemente em rosmanol, epirosmanol e 7-metilepirosmanol. 28
Figura 9 – Estrutura química das catequinas presente no chá verde. 29
Figura 10 – Reação do ácido gálico com molibdênio, composto do reagente Folin-Ciocalteau. 33
Figura 11 – Reação de redução do Fe pelo método FRAP. 34
Figura 12 - Reação química entre o antioxidante BHT e o radical DPPH. 35
Figura 13 - Estrutura fenólica do extrato de alecrim e extrato de chá verde, respectivamente, das matérias-primas utilizadas. 38
Figura 14 – Processamento das amostras de hambúrguer 40
Figura 15 – Cozinha experimental da AFA, local da realização da avaliação sensorial das amostras. 49
Figura 16 – Ficha de avaliação sensorial das amostras 50
Figura 17 – Valores médios de índice de TBARS das amostras de hambúrgueres com elevada dosagem dos antioxidantes, durante estocagem congelada (-18ºC). ..57
Figura 18 - Testes experimentais das amostras de hambúrguer. 63
Figura 19 - Valores de TBARs das amostras de hambúrguer de frango ao longo do tempo 64
Figura 20 - Comparação dos valores de TBARs com as diferentes dosagens calculadas pelos resultados dos métodos FRAP e DPPH do extrato de chá verde ..67
Figura 21 - Comparação dos valores de TBARs com as diferentes dosagens calculadas pelos resultados dos métodos FRAP e DPPH do extrato de alecrim 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos ácidos graxos de diferentes tipos de carne.....4
Tabela 2 – Tipos de antioxidantes de acordo com sua classificação 22
Tabela 3 – Antioxidantes sintéticos, efetividade e estabilidade. 23
Tabela 4 – Formulações dos hambúrgueres de frango. 39
Tabela 5 – Formulações dos hambúrgueres de frango com elevadas dosagens dos antioxidantes 41
Tabela 6 - Equação da reta calculada pela % inibição do DPPH versus Concentração (mg/L).....45
Tabela 7 – Poder redutor (PR) de diferentes antioxidantes comerciais 51
Tabela 8 – Atividade antioxidante total (AAT) de diferentes antioxidantes comerciais 52
Tabela 9 - Atividade de inibição do DPPH (EC 50) dos antioxidantes 54
Tabela 10 – Média da aceitabilidade da avaliação sensorial dos hambúrgueres no teste preliminar com doses elevadas de antioxidantes naturais.....56
Tabela 11 – Média da composição centesimal das amostras de hambúrguer. 58
Tabela 12 – Valores de pH das amostras 59
Tabela 13 - Valores médios de redução do diâmetro (%) dos hambúrgueres.....61
Tabela 14 - Valores médios de aceitação das amostras ao longo do tempo 68

LISTA DE SIGLAS

AAT	atividade antioxidante total
Abs	Absorbância
ABTS	2,2-anzinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOM	*Activity Oxygen Method*
BHA	butil hidroxianisol
BHT	butil hidroxitolueno
CMS	carne mecanicamente separada
DFD	*dark, firm, dry*
DPPH	redução do radical livre estável 2,2-difenil-1-picriihidrazila
EAG	equivalente ácido gálico
EC	Epicatequina
ECG	galato-3-epicatequina
EDTA	sais de ácido etileno diamino tetra acético
EGC	Epigalocatequina
EGCG	galato-3-epigalocatequina
ET	*electron transfer*
FAO	*Food and Agriculture Organization*
FC	reagente Folin-Ciocalteu
FDA	*Food and Drug Administration*
FRAP	poder de redução do ferro
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
HAT	*hydrogen atom transfer*
HPLC	*high performance liquid chromatography*
IDA	ingestão diária aceitável
IP	índice de peróxido
IUPAC	*Internation Union of Pure and Applied Chemistry*
JECFA	*Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants*
LDL	lipoproteína de baixa densidade
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDA	Malonaldeído

Mols	Moléculas-grama
ORAC	capacidade de absorção do radical oxigênio
OSI	*Oil Stability instrument*
PG	galato de propila
pH	potencial hidrogeniônico
PR	poder redutor
PSE	*pale, soft, exudative*
PUFA	ácidos graxos poliinsaturados
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TBAR	teste do ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
TCA	ácido tricloroacético
TEAC	capacidade antioxidante do equivalente Trolox
TEP	Tetraetoxipropano
TMP	Tetrametoxipropano
TOTOX	valor total de oxidação
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
TRAP	parâmetro do radical total
USDA/FSIS	*United States Department of Agriculture´s Food Safety and Inspection Service*
UV-VIS	Ultravioleta Visível
VDR	Valor Diário Recomendado
WHO	*World Health Organization*
WOF	*Warned-over flavour*

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
C16:1	16 Carbonos com 1 insaturação
C18:1	18 Carbonos com 1 insaturação
C18:2	18 Carbonos com 2 insaturações
C18:3	18 Carbonos com 3 insaturações
Cu (II)	cobre valência 2
EC 50	concentração efetiva (*Effective concentration*)
Fe^{2+}	ferro valência 2
Fe^{3+}	ferro valência 3
g	Gramas
kg	Quilograma
mg	Miligrama
mg/g	miligrama por grama
mg/kg	miligrama por quilograma
mg/kg p.c.	miligrama por quilograma de peso corporal
mL	Mililitros
mm	Milímetros
N	Normalidade
nm	Nanômetros
ppm	partes por milhão
µg/dia	micrograma por dia
µL	Microlitro
µM	micro mol por litro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
2.1 Carne de frango 3
2.1.1 Composição da carne de frango 3
2.1.2 Aspectos sócio-econnômicos da carne de frango no Brasil 4
2.1.3 Hambúrguer 6
2.2 Oxidação Lipídica 7
2.2.1 Autoxidação – mecanismo de reação 8
2.2.2 Oxidação lipídica em carnes e derivados 10
2.2.2.1 Fatores que condicionam a oxidação em produtos cárneos 11
2.2.2.2 Implicações da oxidação lipídica em produtos cárneos 12
2.3 Métodos de avaliação lipídica em alimentos 15
2.3.1 Análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) 17
2.3.2 Estabilidade oxidativa e a avaliação sensorial de alimentos 18
2.4 Sistemas antioxidantes em alimentos 20
2.4.1 Classificação e mecanismo de ação dos antioxidantes 21
2.4.2 Antioxidantes sintéticos 23
2.4.3 Antioxidantes naturais 25
2.4.4 Antioxidantes naturais em produtos cárneos 30
2.5 Métodos de avaliação da atividade antioxidante 31
2.5.1 Método Folin-Ciocalteau 32
2.5.2 Método FRAP 33
2.5.3 Método DPPH 34

3. OBJETIVOS.....36
3.1 Objetivo Geral.....36
3.2 Objetivos específicos:.....36
4 MATERIAL E MÉTODOS 37
4.1 Material.....37
4.2 Delineamento experimental.....38
4.3 Determinação do poder antioxidante dos extratos naturais comerciais e do BHA 42
4.3.1 Determinação do poder redutor pelo método Folin-Ciocalteau 42
4.3.2 Determinação da atividade antioxidante total pelo FRAP.....43
4.3.3 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH 44
4.4 Caracterização Físico-Química dos hambúrgueres.....45
4.4.1 Composição Centesimal.....45
4.4.2 Avaliação do pH 46
4.5 Avaliação da estabilidade durante estocagem 46
4.5.1 Determinação do rendimento e redução do diâmetro por cozimento 47
4.5.2 Determinação instrumental da cor.....47
4.5.3 Teste das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) 48
4.5.4 Avaliação Sensorial 49
4.6 Análise dos resultados 50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 50
5.1 Determinação do poder antioxidante.....50
5.1.1 Determinação do poder redutor pelo método Folin-Ciocalteau 51
5.1.2 Determinação da atividade antioxidante total pelo FRAP.....52
5.1.3 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH 53
5.2 Testes Preliminares 55

5.3 Caracterização físico-química dos hambúrgueres de frango 58
5.3.1 Composição centesimal 58
5.3.2 Avaliação do pH 59
5.4 Avaliação da estabilidade durante estocagem sob congelamento 60
5.4.1 Rendimento e redução do diâmetro no cozimento 60
5.4.2 Cor instrumental 61
5.4.3 Teste TBARS 63
5.4.4 Avaliação sensorial 68
6 CONCLUSÃO 70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 71

1. INTRODUÇÃO

A fração lipídica dos alimentos está relacionada a diversas características sensoriais que podem sofrer alterações devido ao processo oxidativo, como mudança de cor, textura, sabor e odor. Gordura animal é suscetível a oxidação quando exposta ao oxigênio, proveniente do ar atmosférico, o que resulta na produção de odores e aromas desagradáveis. Consequentemente a oxidação lipídica influencia na vida útil desses produtos podendo levar à rejeição por parte do consumidor final.

A carne de frango é mais suscetível a oxidação lipídica do que a carne bovina, pois tem uma proporção maior de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) na sua composição, originando radicais livres (substâncias que aceleram a oxidação), formando óxidos de colesterol, alterando a composição de ácidos graxos e formando compostos voláteis. Estes promovem alterações sensoriais, ocasionando a redução do valor nutricional e a formação de compostos tóxicos (compostos poliméricos e óxidos de colesterol) durante o processamento e armazenamento (MELO; GUERRA, 2002; KARPINSKA; BOROWSKI; DANOWSKA-OZIEWICZ, 2001). Por sua vez, maior é a utilização de antioxidantes para retardar a oxidação de alimentos durante processamento e estocagem, aumentando a vida útil desses produtos (CASTRO, 2008).

Os antioxidantes sintéticos, como BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno), TBHQ (t-butil-hidroquinona) e PG (galato de propila), são os mais aplicados. O BHA e o BHT têm uso restrito na aplicação em carnes e produtos cárneos, sendo que, o TBHQ não é permitido pela legislação vigente (MAPA, IN nº 51, 2006). Por outro lado, tem aumentado a busca por antioxidantes naturais devido à percepção negativa dos consumidores sobre a segurança dos antioxidantes

sintéticos, os quais têm sido restringidos devido ao seu potencial de carcinogênese, bem como outros efeitos maléficos à saúde (CHEN; PEARSON; GRAY, 1992; CONNING; PHILLIPS, 1986; KIRKPATRICK; LAURES, 1986).

A adição de condimentos a carne de frango, além de conferir as características organolépticas desejadas, também pode auxiliar na sua preservação, prevenindo ou retardando sua deterioração durante o processamento ou armazenamento (MARIUTTI, 2009). Recentemente, as propriedades funcionais dos extratos de plantas, como chá verde, têm sido investigadas devido tanto ao seu potencial antioxidante como pelas suas atividades nutracêuticas (VALENCIA, 2008).

Segundo Aberle et al. (2001) inúmeras investigações do uso de especiarias, como óleos de mostarda e alho, demonstraram que esses tem efeito preservativo tendo ação antibacteriana ou antioxidante. Existem algumas opções de extratos naturais, como por exemplo, extrato de alecrim, que podem ter ação antioxidante em produtos cárneos, que tem a função de neutralizar os radicais livres provenientes da oxidação lipídica interrompendo sua reação e propagação.

Nesse sentido, diversos trabalhos comprovam que extratos naturais, como o alecrim e chá verde, apresentam atividade antioxidante significativa e em função dos possíveis problemas tóxicos pelo consumo dos antioxidantes sintéticos, as pesquisas sobre antioxidantes naturais se fazem necessárias, permitindo comparar a atividade antioxidante dos produtos naturais em relação aos sintéticos, buscando uma redução ou até mesmo a substituição total dos antioxidantes sintéticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1CARNE DE FRANGO

A carne de frango oferece nutrientes necessários na sua composição, como proteínas, lipídios, minerais e vitaminas, que variam em função da raça, idade e condições higiênicas dos animais e ainda da qualidade na produção e estocagem da carne elaborada (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007).

2.1.1 COMPOSIÇÃO DA CARNE DE FRANGO

No Brasil, as carnes mais consumidas são bovina, frango e suína. Sendo, em geral, constituídas de 80 a 60% de água e 15 a 25% de proteína, o restante formado principalmente por gorduras, sais, pigmentos e vitaminas (BRAGAGNOLO, 2001).

A carne de frango pode ser classificada de acordo com os três principais cortes comerciais: carcaça inteira com pele, coxa-sobrecoxa com pele e peito sem pele. Considerada uma fonte estrutural, regulatória e energética ao organismo humano devido a grande quantidade de proteína em sua composição: cem gramas de frango (carcaça inteira) correspondem a 24,8% do VDR (OLIVO, 2006).

As carnes também são descritas como alimentos com alto teor de gorduras saturadas, considerados seus ácidos graxos hipercolesterolêmicos. Entretanto, as carnes também apresentam em sua composição gorduras monoinsaturadas e poliinsaturadas, consideradas gorduras benéficas por reduzirem os triacilgliceróis

(BRAGAGNOLO, 2001).

Segundo Bragagnolo (2001), comparando a composição lipídica das carnes, observa-se maior quantidade de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturadas na carne de frango (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição dos ácidos graxos de diferentes tipos de carne

Ácidos graxos (%)	Carne bovina	Carne suína	Carne de frango
Saturados	45 ± 4	40 ± 2	33 ± 1
Monoinsaturados	40 ± 4	44 ± 2	46 ± 2
Poliinsaturados	7 ± 4	14 ± 2	21 ± 1

Fonte: Bragagnolo, 2001

A maior concentração de lipídios está na pele do frango, totalizando de 43 a 56% (ALVES; PRUDÊNCIO, 2002; BRAGAGNOLO, 2001). A carne de peito do frango é considerada a parte “magra” do frango, tendo em sua composição de 1 a 2% de lipídios totais, sendo o restante, aproximadamente, 72% de umidade, 24% de proteína e 1,4% cinzas (BRAGAGNOLO, 2001; SANFELICE et al., 2009).

2.1.2 ASPECTOS SÓCIO-ECONÔMICOS DA CARNE DE FRANGO NO BRASIL

O Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango do Mundo e o primeiro exportador. Do ano de 2000 até 2011 houve um aumento de produção de 118%, totalizando 13,05 milhões de toneladas de carne de frango produzida em 2011. Sendo destinados 69,8% ao mercado interno e 30,2% a exportações (UBABEF, 2012).

O consumo anual de carne de frango no Brasil em 2011 foi de 47,38 kg por habitante, o que representa alta demanda na busca por esse tipo de carne, ficando atrás somente da carne bovina (UBABEF, 2012). Segundo estudo de Muller, Paschoal e Santos (2012) existem razões para a grande demanda de carne de frango no Brasil, como: carne mais saudável que a carne vermelha, é mais barata e apresenta maior conviniência para o preparo. Nascimento, Loguercio e Camargo (2007), realizaram estudo sobre o consumo de carne de frango na cidade de Porto Alegre e evidenciaram que a carne de frango é uma das carnes mais apreciadas pelo consumidor perdendo somente da carne bovina. Nesse estudo foram entrevistados 393 consumidores de carne de frango e questionados quanto ao tipo de corte da carne mais consumida por eles o que demonstrou que mais de 90% dos entrevistados consomem os cortes de frango e não o frango inteiro. Também foram levantadas as características importantes na avaliação da carne de frango o que podemos observar na Figura 1 que a validade é um dos aspectos mais importantes a ser considerado na compra do produto.

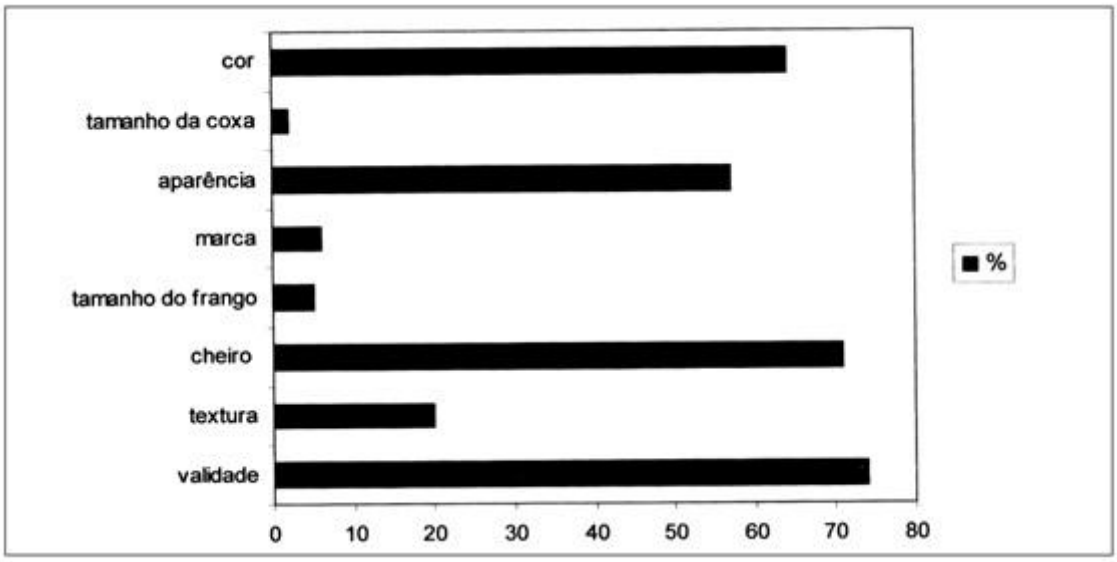


Figura 1 - Características importantes na avaliação da carne de frango. Fonte: Nascimento; Loguercio; Carmargo, 2007.

Nesse aspecto pode-se perceber a importância da carne de frango para a

economia do país dentro do mercado mundial de agronegócio e que os consumidores estão cada vez mais exigindo qualidade nos produtos alimentícios que adquirem. Portanto, a garantia de manutenção do mercado de carne de frango no Brasil consiste no fornecimento de produtos com alto valor agregado baseado na segurança alimentar e principalmente qualidade sensorial e vida de prateleira.

2.1.3 HAMBÚRGUER

Produtos cárneos processados são aqueles que sofreram alterações físicas ou químicas com a finalidade de tornar o produto mais atrativo para o consumidor ou prolongar sua vida útil. O hambúrguer é um produto cárneo processado que tem feito parte do hábito alimentar da população brasileira tendo o seu consumo aumentado significativamente, pois, trata-se de um produto de fácil preparo e apresenta características sensoriais e nutricionais (alto teor de proteínas, lipídios, vitaminas e minerais) que agradam o consumidor (QUEIROZ et al., 2005).

Segundo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Hambúrguer:

> Entende-se por hambúrguer o produto cárneo industrializado, obtido de carne moída dos animais de açougue, adicionado ou não de tecido adiposo e ingredientes, moldado e submetido a processo tecnológico adequado. Trata-se de produto cru, semi-frito, cozido, frito, congelado ou resfriado. (BRASIL, 2000)

Ainda de acordo com Brasil (2000), os produtos classificados como hambúrguer devem atender as seguintes características físico-químicas: máximo de gordura: 23%, mínimo de proteína: 15%, carboidratos totais: 3%, máximo teor de cálcio (em base seca): 0,1% no hambúrguer cru e 0,45% no hambúrguer cozido. É permitida a adição máxima de 4% de proteína de origem não cárnea, também é permitida adição de água como ingrediente opcional e outros como: gordura animal ou vegetal, sal, leite em pó, açúcares, maltodextrina, aditivos intencionais,

condimentos, aromas e especiarias, vegetais, queijos e outros recheios.

2.2 OXIDAÇÃO LIPÍDICA

A oxidação lipídica é dos principais problemas encontrados em relação à preservação dos alimentos durante o seu processamento e armazenamento. Todos os alimentos que contém lipídios na sua composição estão suscetíveis à oxidação lipídica (SOARES et al., 2012).

Os lipídios são constituídos por ácidos graxos, os quais são classificados em ácidos graxos saturados, monoinsaturados ou poliinsaturados. Todos são componentes oxidáveis em diferentes graus, sendo os ácidos graxos insaturados mais suscetíveis ao processo oxidativo (RAMALHO; JORGE, 2006).

Segundo estudo de Shahidi e Ho (2007) quanto maior o número de insaturações na estrutura molecular dos ácidos graxos, maior é o grau de oxidação lipídica.

Os compostos lipídicos podem ser oxidados por diferentes reações: hidrolítica ou lipolítica, enzimática, fotoxidação ou autoxidação (RAMALHO; JORGE, 2006).

A rancidez pode ser classificada em hidrolítica enzimática e hidrolítica não enzimática. As reações hidrolíticas enzimáticas são catalisadas pelas enzimas lipases, distribuídas nos alimentos ou de origem microbiana, causando a hidrólise das moléculas de triglicerídeos em seus ácidos graxos constituintes, ocasionando mudanças na cor e sabor dos alimentos. A hidrolítica não enzimática segue o mesmo princípio da enzimática, quebra dos triglicerídeos, na presença de água e altas temperaturas, como o processo de fritura dos alimentos (HAMILTON, 1989).

A oxidação enzimática ocorre pela ação das enzimas, como por exemplo as lipoxigenases, que catalisam a adição do oxigênio aos ácidos graxos poliinsaturados formando peróxidos, hidroperóxidos e compostos com aromas voláteis indesejados (RAMALHO; JORGE, 2006; SOARES, 2012).

A reação de fotoxidação ocorre pela absorção da radiação ultravioleta na presença de fotossenbilizadores como clorofila, mioglobina, riboflavina e outros, modificando o oxigênio triplete ($^3O_2$) no oxigênio mais reativo, o singlete ($^1O_2$) que, por sua vez, reage diretamente com as ligações duplas dos ácidos graxos insaturados (LH) originando primeiramente o radical peróxido ($LOO^{\bullet}$) e consequentemente hidroperóxidos (equação 1). Na decomposição dos hidroperóxidos formam-se os aldeídos, alcoóis e hidrocarbonetos (CUPPETT; SCHNEPF; HALL, 1951; RAMALHO; JORGE, 2006; SOARES, 2012).

$$^1O_2 + LH \longrightarrow LOO^{\bullet} \longrightarrow LOOH \quad (1)$$

A autoxidação é o tipo mais importante, pois representa o principal mecanismo de oxidação lipídica, e provoca alterações sensoriais indesejáveis e irreversíveis. A reação inicia pela presença do oxigênio atmosférico ou dissolvido na atmosfera, com a interação de iniciadores, que reagem com os ácidos graxos insaturados contidos nos alimentos; uma vez iniciada, a reação segue em cadeia (FERRARI, 1998).

2.2.1 AUTOXIDAÇÃO – MECANISMO DE REAÇÃO

A autoxidação envolve a reação de ácidos graxos insaturados com o oxigênio, consideradas reações autocatalíticas em cadeia, que ocorrem em três etapas: iniciação, propagação e término (Figura 2).

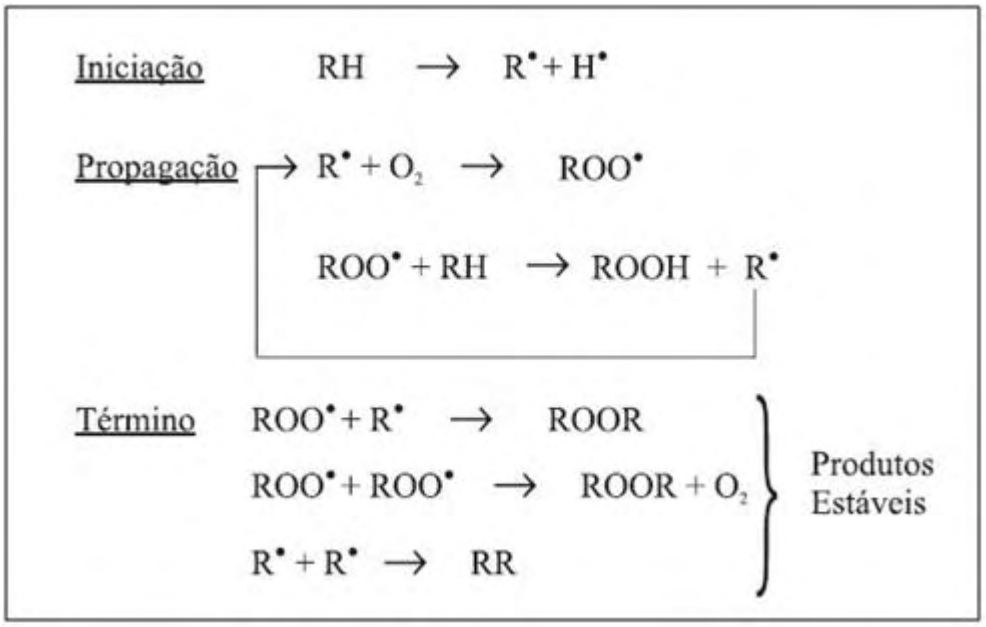


Figura 2 – Esquema geral do mecanismo da autoxidação. Fonte: Ramalho e Jorge (2006)

Na etapa de iniciação o ácido graxo (RH), em condições favorecidas por luz, calor, metais etc (iniciadores), forma o radical livre ($R^{\bullet}$) devido à retirada do hidrogênio do carbono alílico na molécula (RAMALHO; JORGE, 2006).

A propagação consiste na reação em cadeia, com alto consumo de oxigênio, onde o radical livre ($R^{\bullet}$) reage com o oxigênio (O_2) para formar o radical peróxido ($ROO^{\bullet}$). Essa etapa envolve a continuação e aceleração da iniciação, uma vez que, nesse estágio o radical peróxido pode abstrair o átomo de hidrogênio do ácido graxo, produzindo mais radicais livres para reação com o oxigênio, formando os hidroperóxidos, portanto, nessa fase que aparecem os produtos primários da oxidação, cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos (CUPPET; SCHNEPF; HALL, 1951; RAMALHO; JORGE, 2006).

O término é a etapa em que os radicais livres começam a reagir entre si formando produtos finais mais estáveis ou menos reativos (dímeros ou polímeros). Os radicais peróxidos, por sua vez, também podem sofrer epoxidação, polimerização ou reagir com outro radical livre. Os hidroperóxidos sofrem decomposição formando alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres e outras substâncias menos reativas. Portanto, nessa etapa, por cisão e rearranjo dos peróxidos, que são produzidos os produtos secundários de oxidação com odor e sabor desagradáveis.

As reações de polimerização que ocorrem nessa etapa podem gerar escurecimento e aumento de viscosidade no produto (CUPPET; SCHNEPF; HALL, 1951; FERRARI, 1998; RAMALHO; JORGE, 2006).

2.2.2 OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CARNES E DERIVADOS

Carnes e produtos cárneos são produtos suscetíveis a alterações físico-químicas, como a oxidação lipídica, e alterações microbiológicas, devido a sua composição de umidade, lipídios, proteínas e nutrientes (OLIVO, 2006).

A oxidação lipídica em carnes e seus derivados envolve os lipídios das membranas celulares e está relacionada também a oxidação dos pigmentos das carnes, uma vez que, a oxidação do pigmento pode catalisar a oxidação lipídica; da mesma forma, a formação dos radicais livres no processo de oxidação lipídica da carne podem oxidar o átomo de ferro ou desnaturar a molécula de mioglobina, alterando sua cor (ANDERSEN et al., 2003; OLIVO, 2006).

De forma geral, a oxidação lipídica e a oxidação dos pigmentos ocorrem em três fases: (1) in vivo, antes do abate; (2) pré-abate e logo após abate; (3) processamento e armazenamento.

Na fase 1 a oxidação ocorre no animal vivo e se inicia nas frações fosfolipídios das membranas celulares desses animais, que são ricas em ácidos graxos polinsaturados. Mesmo em condições fisiológicas normais, os animais sofrem ação de agentes estressantes de fontes internas e externas, muitos desses atuam como catalisadores ou iniciadores das reações de peroxidação e assim a formação dos radicais livres, alterando a estrutura das membranas e o metabolismo celular, o que significa perda na qualidade da carne, como perdas exsudativas ou de nutrientes (MORISSEY et al., 1998; OLIVO, 2006; SOARES, 2002).

A segunda fase é caracterizada pela conversão do músculo em carne que ocorre imediatamente no pré-abate e durante o pós-abate. As mudanças ocorridas tornam a carne mais suscetível a oxidação lipídica e a oxidação da mioglobina,

devido a falta da corrente sanguínea e do sistema antioxidante natural do organismo do animal, iniciando o processo de peroxidação autocatalítica. Nessa fase a qualidade da carne está relacionada diretamente com as condições durante a vida do animal no pré-abate como alimentação e estresse e também no pós-abate como pH e temperatura da carcaça (MORISSEY et al., 1998; OLIVO, 2006).

A fase mais significativa em relação à oxidação é a terceira fase, pois nessa fase ocorre a liberação do ferro catalítico ativo da mioglobina e de outras proteínas, catalisando a reação da oxidação lipídica nos ácidos graxos insaturados, liberando radicais livres e a propagação das reações oxidativas, as quais são favorecidas quando o produto estiver exposto a oxigênio, temperatura e luz, presentes nessa fase que ocorre durante a desossa, processamento, cozimento, estocagem e exposição ao ambiente (MORISSEY et al., 1998; OLIVO, 2006).

A deterioração da carne é um processo dinâmico onde ocorrem diversas alterações e fenômenos complexos, por esse motivo de difícil controle. A oxidação lipídica e do pigmento da mioglobina, são consideradas as principais causas da deterioração da carne e derivados, são reações que afetam a estabilidade dos lipídios com a formação de compostos químicos indesejáveis, alterações sensoriais e formação de componentes tóxicos (DRUMM; SPANIER, 1991; OLIVO, 2006).

2.2.2.1 FATORES QUE CONDICIONAM A OXIDAÇÃO EM PRODUTOS CÁRNEOS

A oxidação em produtos cárneos e derivados é catalisada por diversos fatores como: composição de ácidos graxos, processamento, presença de oxigênio, temperatura, presença de metais e luz (SELANI, 2010).

Durante o processamento, os produtos cárneos sofrem algumas modificações físicas, as quais interferem na estrutura do músculo e expõe os lipídios a um ambiente pró-oxidante (maior contato com o ar atmosférico), fazendo com que ocorra uma maior interação com agentes pró-oxidantes que catalisam a reação de oxidação lipídica (BERGER, 1994; SELANI, 2010).

O emprego de embalagens de baixa permeabilidade ou à vácuo, assim como, de sequestrantes de oxigênio (ácido ascórbico e seus sais) ou absorvedores de oxigênio são recomendados em produtos cárneos para minimizar o contato dos produtos com o oxigênio, retardando a oxidação e assim aumentando a vida útil desses produtos (BARRERA-ARELLANO, 1998; SELANI, 2010).

O aumento da temperatura também aumenta a taxa de autoxidação, a velocidade de reação do oxigênio com os lipídios praticamente dobra a cada 10ºC de aumento da temperatura, resultando em aumento na concentração de radicais livres e a propagação das reações em cadeia. Manter os produtos sobre refrigeração ou congelamento não irá impedir a oxidação lipídica, mas esta ocorrerá em uma velocidade reduzida (BERGER, 1994; SELANI, 2010). Segundo Jacobsen (2010), durante o processo de cozimento de carnes e produtos cárneos ocorre o desenvolvimento do *warned-over flavour* (WOF) que é o termo utilizado para descrever a oxidação dos aromas das carnes, que, por sua vez, é causada pela oxidação dos lipídios e consequentemente pela formação de compostos como hexanal, octenal, nonenal e decenal.

Alguns metais como ferro, cobre, níquel e manganês, sob a forma de íons polivalentes em pequenas concentrações, agem como pró-oxidantes ativos; 0,02 ppm de Cobre ou 0,5-1 ppm de Ferro já contribuem significativamente na catalise das reações, além disso, traços de gordura oxidada também aceleram as reações de oxidação. A limpeza e higienização das plantas produtoras dos produtos cárneos são de extrema importância para controle microbiológico e de oxidação lipídica (BERGER, 1994; FLIEDER; ORTHOEFER, 1981).

A oxidação lipídica também é catalisada pela absorção da luz, evidenciado no processo de fotoxidação. A luz promove oxidação devido ao oxigênio singlete que não é inibido pela ação dos antioxidantes (BERGER, 1994).

2.2.2.2 IMPLICAÇÕES DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM PRODUTOS CÁRNEOS

A ingestão de alimentos que contêm produtos da oxidação lipídica apresenta risco ao ser humano, pois as substâncias produzidas são consideradas tóxicas como: cetonas, aldeídos, alcoóis, ácidos e hidrocarbonetos. Essas substâncias podem provocar degeneração hepática e renal e distúrbios nos níveis séricos de diversas enzimas. Os aldeídos gerados combinam-se com diversas moléculas no organismo, provocando modificações de proteínas, lipídios e carboidratos. Além desses efeitos, produtos cárneos tem em sua composição colesterol, que é um lipídio insaturado e instável, portanto sujeito a oxidação com a formação de óxidos de colesterol, o qual também apresenta efeito tóxico com ação citotóxica, aterogênicas, mutagênica e carcinogênica (CHIZZOLINI; NOVELLI; ZANARDI, 1998; FERRARI, 1998; OLIVO; SANTOS; FRANCO, 2006; SELANI, 2010).

A cor, odor e o sabor são atributos de qualidade que mais influenciam na aceitabilidade pelo consumidor na compra de produtos cárneos, essas são características que sofrem modificações com a oxidação lipídica.

A cor da carne e a oxidação lipídica são interdependentes, pois a oxidação do pigmento catalisa a oxidação lipídica, por sua vez, os radicais livres formados na oxidação lipídica podem oxidar o átomo de ferro ou desnaturar a molécula de mioglobina, promovendo a modificação da cor de carnes, pela transformação do pigmento oximioglobina, de coloração vermelho brilhante, em metamioglobina, de cor marrom, normalmente rejeitada pelo consumidor (Figura 3) (FERRARI, 1998; OLIVO, 2006).

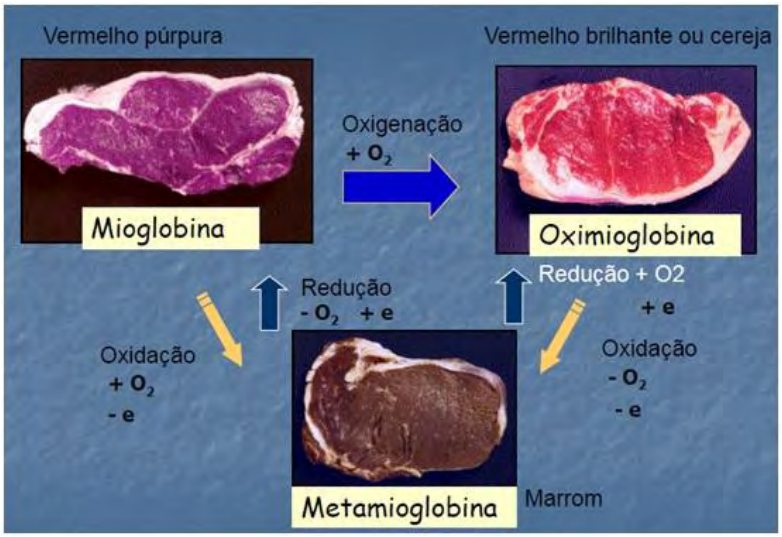


Figura 3 – Formas da mioglobina em carnes. Fonte: Beraquet, 2010.

Os produtos secundários formados no processo de oxidação lipídica como: aldeídos, cetonas, alcoóis e hidrocarbonetos são os principais responsáveis pelas mudanças de odor e sabor desagradáveis causadas nesse processo (FERRARI, 1998; JACOBSEN, 2010). Segundo Jacobsen (2010) ambos componentes primários e secundários interagem com proteínas e aminoácidos gerando um significativo impacto no aroma de produtos cárneos durante processamento, cozimento e estocagem, por exemplo, os hidroperóxidos poderão reagir com enxofre, amina e aminoácidos; os componentes secundários poderão reagir com tióis da cisteína.

Durante o processo de cozimento da carne os lipídios são oxidados, alterando seu odor e sabor, o resultado é comparado com o sabor da gordura rança em baixa temperatura e segundo Ranken (1994) se os *off-flavours* já estiverem presentes na carne antes do cozimento eles tendem a persistir depois do processo. A reação de Maillard, entre as proteínas e açúcares redutores da carne, também influencia o sabor da carne no processo de cozimento, resultando no sabor de carne tostada (RANKEN, 1994).

A textura de carnes também é alterado pela oxidação lipídica devido a formação de complexos proteína-lipídio ou provocar cisão de proteínas, e também a formação de polímeros, levando a desnaturação de proteínas, inibição da atividade enzimática e diminuição da solubilidade (FERRARI, 1998).

O valor nutritivo da carne também é afetado no processo de oxidação lipídica devido à degração parcial de vários compostos nutritivos como: ácidos graxos essenciais, vitaminas A, carotenoides, vitamina E (tocoferóis) e vitamina C. Os componentes secundários da oxidação e compostos da reação de Maillard podem reagir com biomoléculas (especialmente proteínas) diminuindo a absorção destas pelo organismo. Os peróxidos formados irritam a mucosa intestinal provocando diarreia e a capacidade de absorção; além disso, os lipídios oxidados são antagonistas de diversos nutrientes, reduzindo o efeito destes (FERRARI, 1998).

2.3MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM ALIMENTOS

A avaliação do estado de oxidação dos alimentos é uma determinação importante para a indústria de alimentos, uma vez que, é um meio de controlar e garantir a qualidade desde a matéria-prima até o produto final, e de determinar a sua vida de prateleira.

Segundo Shahidi e Wanasundara (1951) os métodos válidos para monitorar a oxidação lipídica em alimentos são divididos em dois grupos:

1. Mede os componentes primários da oxidação: perda dos ácidos graxos insaturados, absorção de oxigênio, índice de peróxido e valor de dienos conjugados;

2. Mede os componentes secundários da oxidação: quantificação de compostos carbonílicos e quantificação dos compostos aldeídicos.

O método de escolha depende de diversos fatores incluindo a natureza e o histórico dos ácidos graxos contidos no alimento, a informação necessária, o tempo avaliado e as condições dos testes. Importante que os métodos físico-químicos sejam acrescentados da percepção e aceitabilidade sensorial (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1951; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Segundo Silva, Borges e Ferreira (1999) os métodos para a avaliação do grau de oxidação lipídica também podem ser distinguidos entre testes para determinação da estabilidade oxidativa nas condições normais de armazenamento ou de distribuição e a avaliação da resistência à oxidação efetuada por testes acelerados.

- Análises de oxidação por determinação dos componentes primários

O método para medir as alterações ou decaimento dos ácidos graxos

insaturados da matriz é geralmente realizado por cromatografia gasosa (CG) e trata-se de uma técnica não muito utilizada, pois requer a extração dos lipídios totais e a derivatização, por esse motivo, ocorre a dificuldade de garantir a extração quantitativa e em minimizar as perdas ao nível da preparação de derivados (fosfolipídios, glicolipídios, etc.) (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1951; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

O método de análise mais utilizado para avaliar os componentes primários da oxidação é o método de índice de peróxido (IP). Embora a determinação de IP seja comum para determinação de oxidação lipídica em alimentos, os métodos geralmente são limitados para determinar os estágios iniciais da oxidação, além disso, as condições experimentais (peso da amostra, tempo, temperatura, tipos de peróxidos presentes) influenciam na exatidão dos resultados. Nos alimentos, se faz necessário à extração lipídica para determinação do IP, o que também pode gerar resultados com menor exatidão (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1951; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

- Análises de oxidação por determinação dos componentes secundários

Avaliar a oxidação lipídica dos alimentos por determinação dos componentes secundários da reação de oxidação é mais apropriado que determinar os componentes primários devido às alterações de odor, sabor e cor gerados durante essa etapa (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1951).

Existem diversos métodos na literatura para determinar componentes secundários da oxidação, como: determinação dos compostos aldeídicos; determinação de ácidos oxidados por cromatografia; determinação de compostos voláteis por cromatografia gasosa ou por condutimetria em método acelerado (equipamento Rancimat); e outros como fluorimetria (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1951; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Os métodos mais utilizados são por determinação de compostos aldeídicos que são: teste de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), índice de p-anisidina, teste de Kreis ou índice de ranço e índice de carbonila.

O teste TBARS se baseia na quantificação do principal aldeído formado durante a oxidação no alimento, o malonaldeído (MDA), que reage com o ácido tiobarbitúrico formando um complexo de cor avermelhada que pode ser determinado espectrofometricamente (ELDIN, 2010; ROSSELL, 1994).

2.3.1 ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

O método de análise de oxidação por TBARS é o mais aplicado e considerado relevante para avaliação da oxidação lipídica em carnes e produtos cárneos, principalmente produtos que envolvam processos de moagem, mistura e cozimento, pois favorecem a formação do malonaldeído (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005).

Aldeídos e outros componentes carbonílicos são formados na oxidação lipídica como componentes secundários, que por sua vez, produzem dialdeídos de três carbonos, como o malonaldeído (MDA) ou similar. Os aldeídos, incluindo o MDA, e outras substâncias como as cetonas, cetosteróides, ácidos, ésteres, açúcares, amidas, aminoácidos, proteínas oxidadas, pirimidinas e piridinas podem reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (GUILÉN-SANS; GUZMÁN-CHOZAS, 2010).

O teste de TBARS foi utilizado em carnes e produtos cárneos pela primeira vez por Turner et al. (1954). A reação envolve o ácido 2-tiobarbitúrico com o MDA (Figura 4) formando o complexo TBA-MDA de cor avermelhada, medido por espectrofotometria a 530-532 nm, podendo variar de 500-550 nm. Essa reação ocorre em meio ácido (pH 1-2) e alta temperatura (98 – 100ºC), no sentido de aumentar a sua velocidade e sensibilidade (GUILÉN-SANS; GUZMÁN-CHOZAS, 2010; OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

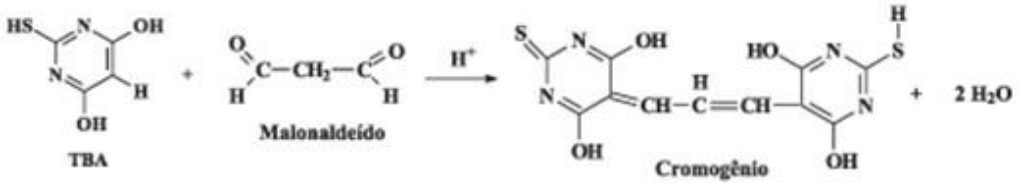


Figura 4 - Reação de TBA com MDA e formação do complexo avermelhado. Fonte: Osawa, Felício e Gonçalves, 2005.

A determinação é feita por quantificação de curva padrão, os padrões mais utilizados para a análise são o 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) e 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) que libera o MDA e etanol, após hidrólise ácida. Os resultados são expressos em unidades de absorbância por unidade de peso da amostra ou em “valor TBA”, definido como a massa, em mg, de MDA por kg de amostra (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

O teste de TBARS tem sofrido modificações para aumentar a sensibilidade de detecção e eliminar interferentes da amostra. O método ainda é o mais usual na avaliação da oxidação de carnes e produtos cárneos devido à sua simplicidade e rapidez (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

2.3.2 ESTABILIDADE OXIDATIVA E A AVALIAÇÃO SENSORIAL DE ALIMENTOS

A avaliação sensorial é a ferramenta mais antiga e também satisfatória para determinar frescor e qualidade dos alimentos. Segundo Texeira (2009), a qualidade sensorial do alimento favorece a fidelidade do consumidor a um produto em um mercado cada vez mais exigente.

A percepção e seleção do alimento é um processo em que o homem utiliza os órgãos do sentido (Visão, Audição, Paladar, Tato e Olfato) e aspectos fisiológicos e psicológicos ligados a fatores intrínsecos e extrínsecos do alimento. Todos esses fatores influenciam o consumidor na decisão de aceitação ou rejeição do alimento (HERNANDES et al., 2007; MORALES et al., 2013).

As técnicas de análise sensorial têm como objetivo: medir a qualidade do alimento em programas de controle de qualidade, determinar a variedade adequada da matéria-prima, determinar e melhor tipo de processamento e armazenamento, correlacionar análise físico-química, determinar a reação do consumidor e determinar a estabilidade de armazenamento dos produtos. Essas técnicas podem utilizar grupos de consumidores para avaliação da preferência ou aceitação ou pequenos grupos para detectar aspectos sensoriais mais específicos (GOUVEIA et al., 2006; HERNANDES et al., 2007; TEIXEIRA, 2009).

O teste de escala hedônica pode ser um método utilizado para determinar a aceitação ou rejeição de um alimento na percepção do consumidor. Nesse método fatores intrínsecos (aparência, aroma, etc.) e fatores extrínsecos (embalagem, rotulagem, etc.) podem ser avaliados, sendo que os principais atributos exigidos pelo consumidor são cor, aparência, textura e sabor (HERNANDES et al., 2007; HUALLANCO, 2004).

Ao se avaliar o aspecto global do alimento, o consumidor primeiramente avalia o aspecto visual em relação a aparência (cor e dimensões do produto) e processos de deterioração do alimento (bolores, leveduras) e após o aroma e sabor no processo de deglutição (HERNANDES et al., 2007). Segundo Huallanco (2004), o gosto e o odor contribuem para o sabor da carne, sendo o sabor um dos atributos decisivos na aceitação do alimento.

O processo de oxidação lipídica nos alimentos contribui para o desenvolvimento de sabor estranho em produtos cárneos. Os produtos secundários da oxidação lipídica têm sido classificados como fator determinante na avaliação sensorial de sabores e odores estranhos em carnes (HUALLANCO, 2004).

O teste de aceitação/preferência tem sido uma ferramenta amplamente utilizada para avaliar a estabilidade dos alimentos em relação aos aspectos sensoriais durante a vida de prateleira dos alimentos e a rejeição ou aceitação do consumidor durante esse processo (ASSIS et al. 2007; BATISTA; BESERRA; SILVA, 2005; CRUZ et al., 2010; MATTIETTO; LOPES; MENEZES, 2007; MORALES et al., 2013; VILLANUEVA; TRINDADE, 2010; WISCHRAL et al., 2010).

2.4SISTEMAS ANTIOXIDANTES EM ALIMENTOS

Os antioxidantes são compostos utilizados em alimentos com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica. Segundo a FDA (*Food and Drug Administration*), os antioxidantes são substâncias utilizadas para preservar alimentos por meio do retardamento da deterioração, rancidez e descoloração decorrentes da autoxidação (SELANI, 2010). Segundo a ANVISA (Portaria nº 540, de 27/10/97), antioxidante é a substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa nos alimentos. Centenas de compostos foram testados por pesquisadores para verificar sua atividade antioxidante, sendo que somente alguns podem ser usados em produtos para consumo humano (RAMALHO; JORGE, 2006).

Segundo Ramalho e Jorge (2006), o uso de antioxidantes foi primeiramente registrado em 1797 e 1817. O uso em alimentos teve início em 1940 com substâncias naturais retiradas da casca de árvores que apresentaram efetividade na conservação de gorduras animais e vegetais (SELANI, 2010).

Apenas alguns compostos reconhecidos como seguros pelas organizações internacionais como a *Food and Agriculture Organization* (FAO), *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA) e a *World Health Organization* (WHO) são permitidos em alimentos. Sendo assim, para serem empregados em alimentos, os antioxidantes devem atender características importantes como: atender a legislação vigente do país a qual o alimento se destina, eficácia em baixas concentrações

(0,001-0,01%), ausência de efeitos sensoriais indesejáveis, fácil aplicação, compatibilidade com o alimento, ser efetivo durante o período de estocagem, ser estável ao processo de aquecimento e preferência do consumidor por antioxidantes naturais (COPPEN, 1994; RAMALHO; JORGE, 2006; SELANI, 2010).

No Brasil, o uso destes antioxidantes é controlado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em carne e produtos cárneos (MAPA, 2006).

2.4.1 CLASSIFICAÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação. Ramalho e Jorge (2006) citam que os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos. Moreira e Mancini (2004) dividem os antioxidantes em duas classes: com atividade enzimática e sem essa atividade. As indústrias de alimentos classificam os antioxidantes em duas categorias: sintéticos e naturais.

Os considerados primários ou sem atividade enzimática são compostos fenólicos que interagem com os radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação de oxidação doando átomos de hidrogênio de suas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (Figura 5) (RAMALHO; JORGE, 2006; SELANI, 2010).

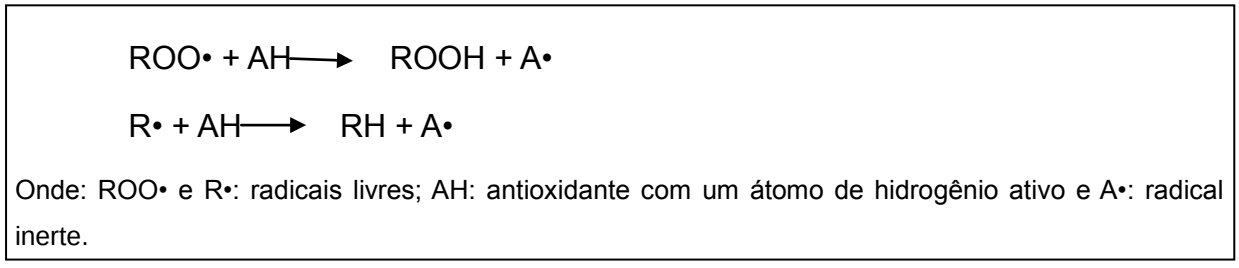


Figura 5 – Mecanismo de ação dos antioxidantes primários.

Os sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante que apresentam efetividade quando combinados com alguns antioxidantes primários. Os removedores de oxigênio atuam capturando o oxigênio presente no meio, tornando-os indisponíveis para atuação como propagadores da autoxidação. Os biológicos são substâncias que podem remover o oxigênio ou alguns compostos reativos ao sistema de reação. Os agentes quelantes ou sequestrantes promovem a ação de complexação com íons metálicos, como ferro e cobre que catalisam a oxidação lipídica. E os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais com atuação semelhante aos antioxidantes primários (RAMALHO; JORGE, 2006).

Tabela 2 – Tipos de antioxidantes de acordo com sua classificação

Classificação	**Antioxidante**
Primários	BHA, BHT, TBHQ, PG, Tocoferóis
Removedores de oxigênio	Ácido ascórbico e seus isômeros (ex: eritorbato de sódio)
Biológicos	PG, Tocoferóis e Enzimas: glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases
Quelantes/Sequestrantes	Ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA)
Mistos	Proteínas hidrolisadas, flavonoides e derivados de ácido cinâmico
Sintéticos	BHA, BHT, PG e TBHQ
Naturais	Tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas como: alecrim, sálvia, chá verde.

Fonte: Ramalho e Jorge, 2006

2.4.2 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são BHA, BHT, TBHQ e PG. O mecanismo de ação desses compostos é atribuído a sua estrutura fenólica (Figura 6) que permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando o ácido graxo e interrompendo o mecanismo de oxidação (RAMALHO; JORGE, 2006).

Tais compostos atendem à maioria das necessidades de proteção lipídica dos alimentos, devido a sua alta efetividade (Tabela 3) quando adicionados aos alimentos tão cedo quanto possível, no processo de fabricação ou no produto acabado (CAMPOS; TOLEDO, 2000).

Tabela 3 – Antioxidantes sintéticos, efetividade e estabilidade.

AOX	Efetividade
BHA	Maior em gordura animal e em ácidos graxos de cadeia curta. Baixa efetividade em óleos vegetais. Apresenta sinergia com PG.
BHT	Similar ao BHA, porém não apresenta sinergia com PG.
PG	Pode atuar como pró-oxidante quando aplicado em níveis elevados. Baixa efetividade em alimentos fritos, massas assadas e biscoitos preparados com gorduras.
TBHQ	Melhor antioxidante para óleos vegetais e para óleos de fritura e similar ao BHA a gordura animal. Sinergia com ácido cítrico. Excelente efetividade em óleos durante estocagem, aumentando a extensão de vida útil desses.

Fonte: Adaptado de Ramalho e Jorge, 2006; Coppen, 1994.

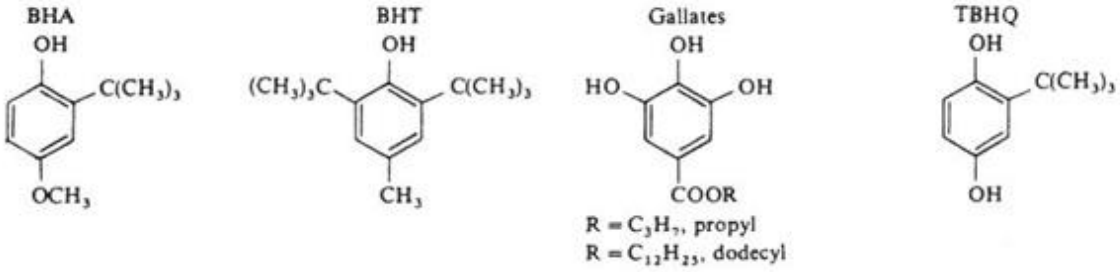


Figura 6 – Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos. Fonte: Coppen, 1994.

A principal preocupação do uso dos antioxidantes sintéticos está relacionada aos possíveis efeitos toxicológicos desses compostos. Devido a essa preocupação, diversas pesquisas foram realizadas para verificar o potencial tóxico desses, sendo que os resultados dos estudos acarretaram na restrição da sua utilização em diversos países (CAMPOS; TOLEDO, 2000; RAMALHO; JORGE, 2006; SELANI, 2010).

O antioxidante TBHQ não é permitido no Canadá e na Comunidade Econômica Européia, mas é aprovado em diversos outros países, no Brasil o Ministério da Saúde limita 200 mg/kg para produtos como óleos e gorduras (BRASIL, 1988). Para carnes e produtos cárneos, regulamentado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o uso de TBHQ não é permitido (MAPA, 2006); O uso do BHA, BHT e PG também tem uso restrito em diversos países, como por exemplo, na aplicação de óleos e gorduras o uso de BHA, BHT e PG nos Estados Unidos é de 200, 200 e 150 mg/kg respectivamente, já em países da Europa o limite ainda é menor, como na Dinamarca que limita o uso do BHA, BHT e PG, no mesmo produto alimentício, em 100, 100 e 50 mg/kg respectivamente. No Brasil, o uso desses antioxidantes é permitido nas dosagens de 200 mg/kg de BHA, 100 mg/kg de BHT e 100 mg/kg de PG, em óleos e gorduras; em produtos cárneos o limite é de 100 mg/kg de ambos BHT e BHA (CAMPOS; TOLEDO, 2000; COPPEN, 1994; MAPA, 2006; RAMALHO; JORGE, 2006).

Embora o uso dos antioxidantes sintéticos seja restringido por cada órgão competente de diferentes países, ainda há uma preocupação da quantidade ingerida

diariamente no consumo de diversos produtos alimentícios industrializados pelos consumidores, os quais atualmente utilizam maiores quantidades de produtos industrializados.

Campos e Toledo (2000) investigaram a quantidade dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ contidas em diferentes amostras de óleos de soja e milho, gordura vegetal hidrogenada, margarina, creme vegetal e halvarina do mercado na região de Campinas, São Paulo, demonstrando que a maioria das amostras analisadas apresentaram quantidades dos antioxidantes de acordo com os níveis máximos permitidos, com exceção de uma das três marcas avaliadas de gordura vegetal, onde dois lotes avaliados ultrapassam em aproximadamente 30% o limite máximo permitido (100 mg/kg). Esse estudo revela que não há um controle específico para verificar se os produtos industrializados seguem o limite máximo permitido em legislação, ocasionando, possivelmente, maior consumo diário desses antioxidantes no país e maior probabilidade de efeitos tóxicos no organismo.

Devido a diversos estudos (ALTMANN et al., 1986; CHEN; PEARSON; GRAY, 1992; CONACHER et al., 1986; CONNING; PHILLIPS, 1986; ITO et al., 1983; IVERSON, 1995; VANDGHANOONI et al., 2013) que comprovam efeitos tóxicos do BHA, BHT e TBHQ valores de IDA (Ingestão Diária Aceitável) foram estabelecidos pelo JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants*). Para o BHA foi estabelecido uma IDA de 0-0,5 mg/kg p.c., para o BHT de 0-0,3 mg/kg p.c. e para o TBHQ de 0-0,7 mg/kg p.c. (BANNWART; TOLEDO, 1999).

2.4.3 ANTIOXIDANTES NATURAIS

O uso de antioxidantes naturais para retardar a oxidação lipídica nos alimentos não é um conceito novo, desde meados de 1980 estudos relacionados a compostos naturais para prevenção ou extensão de vida útil nos alimentos vêm sendo explorados. Essas pesquisas têm sido dirigidas de forma a substituir ou

diminuir o uso dos antioxidantes sintéticos nos alimentos. Uma vez que, desde início dos anos 90 os consumidores tem expressado preocupação sobre a segurança alimentar dos preservantes e aditivos em alimentos, sendo assim, é evidente a tendência da preferência do consumidor em adquirir alimentos industrializados conhecidos como "*clean labeling*", que são alimentos fabricados com aditivos orgânicos/naturais de nomenclatura familiar e vistos como saudável (BREWER, 2011; SELANI, 2010).

Diversas são as fontes dos antioxidantes naturais, o que é demonstrado em pesquisas na busca de novas fontes e verificação de seu potencial antioxidante. Os vegetais, frutas, hortaliças e outros são fontes de antioxidantes naturais devido aos tocoferóis, vitamina C, carotenoides e compostos fenólicos contidos nessas fontes (SHAHIDI, 1996).

Os compostos fenólicos estão presentes nas frutas e vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídios) e proteínas, são originados do metabolismo secundário das plantas, pois são essenciais para seu crescimento e reprodução, além disso, são formados em condições de estresse como infecções, ferimentos, radiações e outros (ANGELO; JORGE, 2007).

Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização e sua estrutura química é baseada em anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Devido a sua grande variação estrutural, os fenóis são multifuncionais existindo cerca de cinco mil tipos, os que se destacam são: flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (ANGELO; JORGE, 2007).

O mecanismo de ação dos compostos fenólicos no processo oxidativo é semelhante aos antioxidantes sintéticos, atuam como sequestradores de radicais, interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons (equação 2) ou hidrogênio aos radicais livres (equação 3), e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação da oxidação. Os produtos intermediários formados são relativamente estáveis devido à ressonância

do anel aromático dessas substâncias (ANGELO; JORGE, 2007; SELANI, 2010).

$$RO° + ArO° \rightarrow ROOAr \quad (2)$$

$$ROO° + ArOH \rightarrow ROOAr \quad (3)$$

RO°e ROO° = radicais livres; ArO° e ArOH = antioxidante natural; ROOAr = radical recuperado

Fonte: Adaptado de Cuppett, Schnepf e Hall, 1996

Os antioxidantes naturais mais utilizados, atualmente, são os tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas como alecrim, sálvia e chá verde (RAMALHO; JORGE, 2006).

O extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis L*.) já está sendo utilizado amplamente pelas indústrias de alimentos, como antioxidante natural, e tem sido objeto de estudo em produtos cárneos: carne de frango resfriada (TANG, et al., 2001), peru cozido (YU, et al., 2002), carne de porco (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al. 2009), salsicha de porco (SEBRANEK et al., 2005), mortadela (JONGBERG, et al., 2013).

Devido a problemas com cor, odor e sabor dos componentes do extrato de alecrim, as indústrias têm desenvolvido extrato de alecrim refinado nas formas líquido e pó e esses têm sido usados em estudos químicos e biológicos (OFFORD et al., 1996). Extratos de alecrim contem um largo número de componentes incluindo o ácido carnósico, carnosol e ácido rosmarínico (Figura 7), que são também conhecidos como diterpenos fenólicos. O ácido carnósico e o carnosol compõem 15% do extrato de alecrim, sendo que esses respondem por mais de 90% da atividade antioxidante do extrato. O ácido rosmarínico também tem atividade antioxidante e é encontrado na concentração de 1-2% no extrato fresco (CUPPETT; SCHNEPF; HALL, 1996; FRANKEL, et al., 1996; OFFORD et al., 1996).

Cuppett, Schnepf e Hall (1996) relatam um estudo sobre a estabilidade dos componentes do extrato de alecrim, evidenciando a conversão do ácido carnósico em carnosol e subsequentemente convertido em rosmanol, 7-metilpirosmanol e

epirosmanol (Figura 8), o que foi facilitado pela exposição de oxigênio, luz e aquecimento. O aumento de níveis de carnosol no extrato pode ser indesejável porque apesar do carnosol ser mais estável que o ácido carnósico este tem menos atividade.

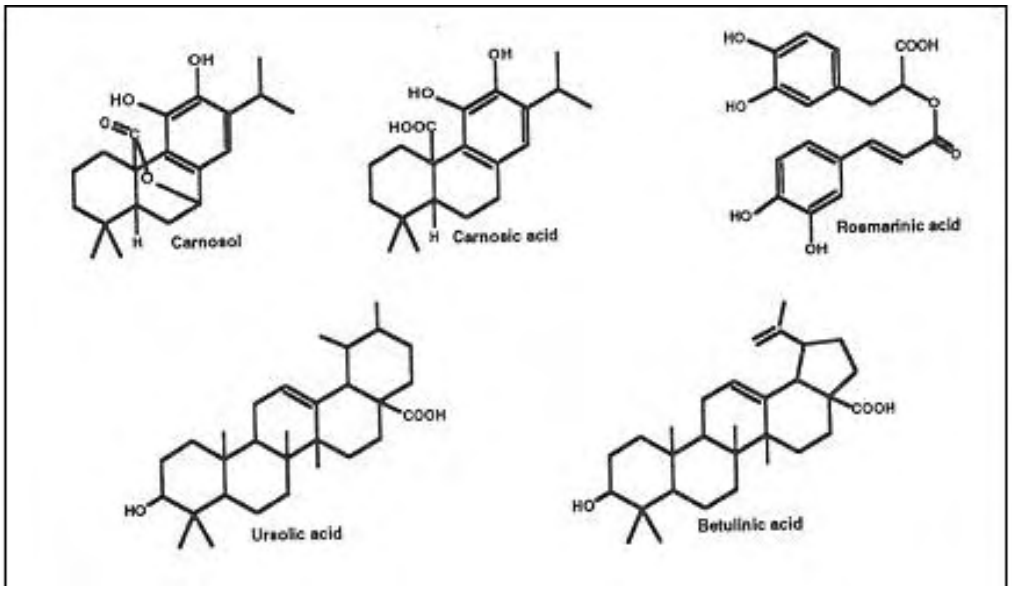


Figura 7 – Estrutura química dos principais componentes do extrato de alecrim. Fonte: Offord et al., 1996.

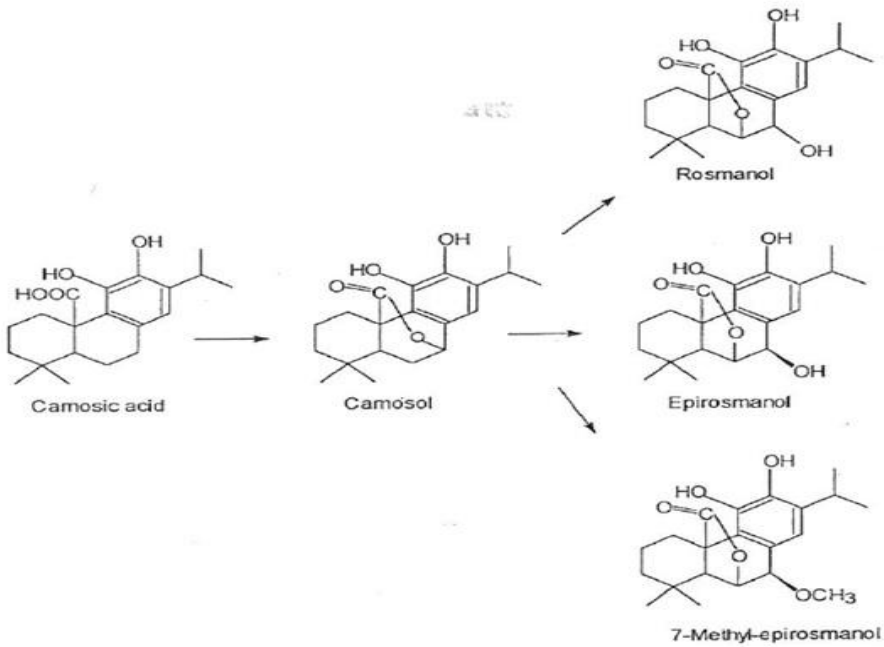


Figura 8 – Conversão do ácido carnósico em carnosol e subsequentemente em rosmanol, epirosmanol e 7-metilepirosmanol. Fonte: Cuppett, Schnepf e Hall, 1996

Extrato de chá também apresenta forte atividade antioxidante, promovendo não somente benefícios à saúde, mas também pode ser usado em alimentos na prevenção da oxidação lipídica. As três maiores formas de extrato de chá conhecidas são: chá verde, chá *Oolong* e chá preto (HO et al., 1951).

Os polifenóis contidos nos extratos de chá são os responsáveis pela atividade antioxidante desses extratos. Os três principais polifenóis existentes nos chás são as catequinas, teoflavinas e teorubígenos. As catequinas são os principais polifenóis encontrado nos extratos de chá verde (HO et al., 1951).

Os extratos de chá verde, extraído da planta *Camellia sinensis*, apresentam quatro diferentes tipos de catequinas com atividade antioxidante (Figura 9): epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), galato-3-epicatequina (ECG) e galato-3-epigalocatequina (EGCG). As catequinas correspondem aproximadamente 26,7-30% dos compostos presentes no chá verde seco, sendo 11% de EGCG, 10% de EGC, 2% de ECG, 2,5% de EC e 15% de polifenóis não identificados. O potencial antioxidante das catequinas presentes no extrato de chá verde apresenta a seguinte ordem descrente de eficiência: EGCG = ECG > EGC = EC (HO et al., 1951; JHOO, 2007; SCHMITZ et al., 2005).

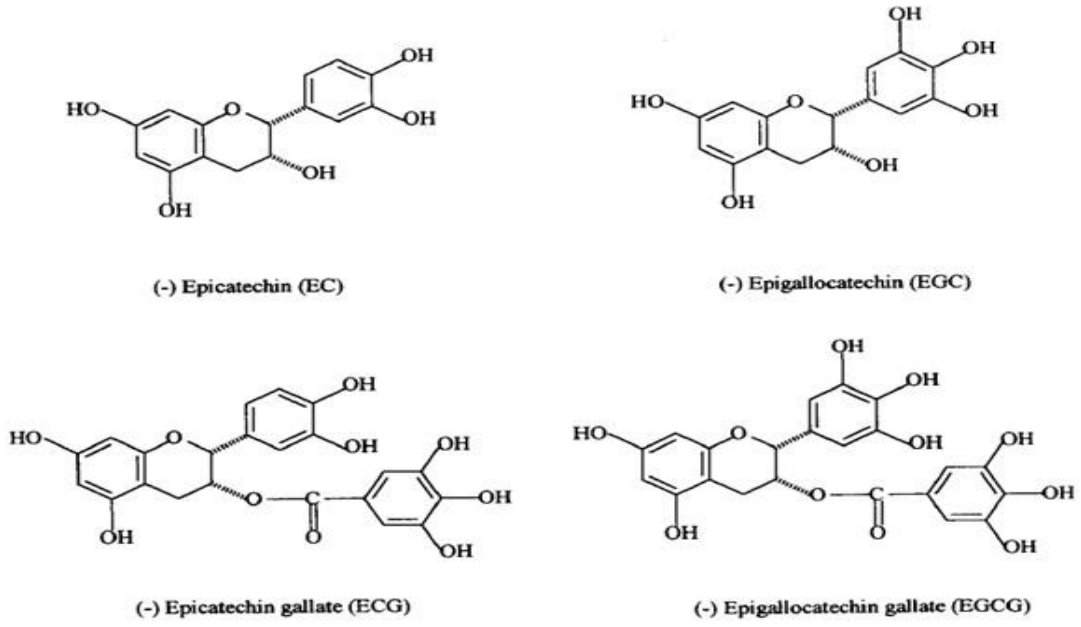


Figura 9 – Estrutura química das catequinas presente no chá verde. Fonte: He e Shahidi, 1997.

2.4.4 ANTIOXIDANTES NATURAIS EM PRODUTOS CÁRNEOS

A busca por produtos naturais tem aumentado significativamente, inclusive na indústria de carne e produtos cárneos. Produto natural em carne e produtos cárneos é definido pela *United States Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Service* (USDA/FSIS) como um produto que não contém "qualquer aroma artificial, corante ou preservadores químicos, ou qualquer outro ingrediente sintético ou artificial" (KARRE; LOPEZ; GETTY, 2013).

A indústria de carne e produtos cárneos tem ativamente procurado soluções naturais para minimizar a oxidação lipídica e aumentar a vida útil dos produtos. Karre, Lopez e Getty (2013) fizeram uma revisão dos estudos realizados com antioxidantes naturais aplicados em carnes e produtos cárneos, evidenciando estudos com frutas (ameixa, extrato de semente de uva, amora, romã e uva-ursina) e plantas (casca de pinheiro, alecrim, orégano e outras especiarias). Todos demonstraram boa eficiência de atividade antioxidante.

Os diversos estudos com extrato de alecrim, como por exemplo, em peru cozido (YU et al., 2002), carne suína (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2009), salsicha de suíno (SEBRANEK et al., 2004) e outros, fizeram com que em 2010 a União Europeia autorizasse o uso de extrato de alecrim como um novo aditivo alimentar para uso em alimentos, incluindo carnes, com número E 392 (KARRE; LOPEZ; GETTY, 2013).

A aprovação do ácido carnósico e carnosol, provenientes do extrato de alecrim, como uma alternativa natural e segura dos antioxidantes sintéticos, fez aumentar ainda mais a tendência de "produtos naturais" nos alimentos e assim, também, o aumento da demanda de pesquisas de compostos naturais como chá verde em carnes e produtos cárneos: carne de frango (TANG et al., 2000), mortadela suína (JONGBERG et al., 2013) e outros.

2.5MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A eficiência antioxidante de compostos bioativos tem sido estudada por diversos pesquisadores nos trabalhos de separação, identificação, quantificação e aplicação dos compostos fenólicos em alimentos. Devido a grande diversidade química existente, em especial entre os compostos fenólicos, os diversos ensaios metodológicos diferem em relação ao mecanismo de reação, as espécies-alvo, as condições reacionais e na forma de expressão dos resultados (ANGELO; JORGE, 2007; GOULART et al., 2009).

Os métodos são influenciados por fatores como natureza do composto, método de extração, tamanho da amostra, condições de estocagem, o padrão utilizado e a presença de interferentes. Dessa forma, não existe uma metodologia universal e esse fato ressalta a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diferentes ensaios, com fundamentos e mecanismos de ação diferentes (ANGELO; JORGE, 2007; GOULART et al., 2009).

Os pesquisadores Huang, Ou e Prior (2005) determinaram que os métodos para avaliar a capacidade antioxidante dependem da reação envolvida, classificando assim, em dois tipos: baseado na reação entre o átomo de hidrogênio com o radical livre (*hydrogen atom transfer* - HAT) e baseado na reação da transferência do elétron livre (*electron transfer* – ET).

Os métodos HAT são baseados na reação de competição entre o antioxidante e o substrato por peróxidos. Esses métodos incluem a inibição da autoxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), a capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), parâmetro do radical total (TRAP) e medidas de branqueamento (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

As avaliações realizadas pelos métodos ET mensuram a capacidade do antioxidante na redução do oxidante, que altera sua cor quando reduzido. Os métodos utilizados são: avaliação dos fenólicos totais pelo reagente Folin-Ciocalteau

(FC), capacidade antioxidante do equivalente Trolox (TEAC), poder de redução do ferro (FRAP), potencial total do antioxidante utilizando complexo Cu (II) e o método DPPH, baseado na redução do radical livre estável 2,2-difenil-1-picriilhidrazila na presença de um antioxidante doador de hidrogênio (CHEN; HO, 2007; HUANG; OU; PRIOR, 2005).

2.5.1 MÉTODO FOLIN-CIOCALTEAU

O método foi determinado por Folin-Ciocalteau em 1927, o qual mede a capacidade redutora das amostras e é o mais extensivamente empregado, popularmente reconhecido como o teste para medir o conteúdo total de fenóis. É um método espectrofotométrico que detecta todos os grupos fenólicos presentes no extrato.

A quantificação consiste na mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico, onde o molibdênio se encontra no estado de oxidação (cor amarela no complexo $Na_2MoO_4.2H_2O$) que em presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os complexos molibdênio-tungstênio [$(PMoW_{11}O_4)^{4-}$] de coloração azul, permitindo assim, a determinação da concentração por absorbância na espectrometria, a leitura pode ser realizada na região do visível em torno de 760 nm (GOULART et al., 2009).

A determinação é realizada utilizando, normalmente, o padrão ácido gálico, em meio básico, que geram ânions fenolatos, os quais por sua vez, sofrem reação de óxidorredução com o agente Folin-Ciocalteau alterando a cor de amarelo para azul (Figura 10).

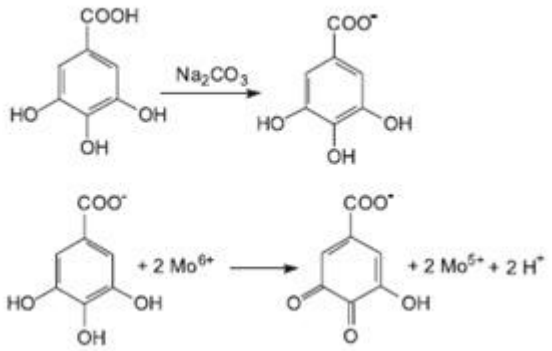


Figura 10 – Reação do ácido gálico com molibdênio, composto do reagente Folin-Ciocalteau. Fonte: Goulart et al., 2009.

A desvantagem do método é que ocorre a determinação de todos os compostos fenólicos no extrato, ocorrendo uma superestimação do conteúdo fenólico (GOULART et al*.,* 2009).

2.5.2 MÉTODO FRAP

O método FRAP (poder antioxidante de redução do ferro) foi determinado por Benzie e Strain em 1996 e é baseado na habilidade de redução do Fe^{3+} para Fe^{2+}, em pH baixo. Na presença de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), com o antioxidante, ocorre a formação do complexo (Fe^{2+} - TPTZ) (Figura 11) de cor azul intensa que pode ser determinado por espectrometria na absorbância de aproximadamente 593 nm.

Segundo Chen e Ho (2007), o método FRAP pode ser utilizado não somente para investigar a eficiência dos antioxidantes no plasma ou em matrizes alimentares e de bebidas, mas também na investigação dos polifenóis puros como um todo.

É um método barato, os reagentes são de fácil preparo, os resultados são

altamente reprodutíveis, e o procedimento é simples e rápido (BENZIE; STRAIN, 1996).

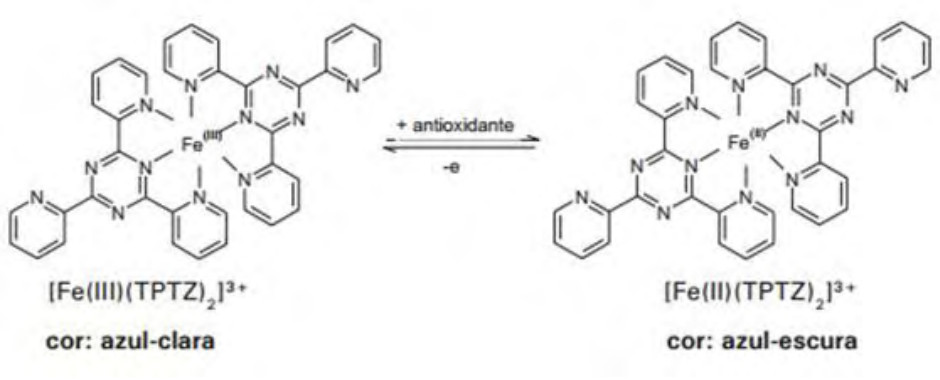


Figura 11 – Reação de redução do Fe pelo método FRAP. Fonte: Rufino et al., 2006.

Thaipong et al. (2006) fizeram um estudo comparando os métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC para estimar a atividade antioxidante dos extratos da fruta de goiaba e concluíram que o método FRAP apresentou alta reprodutibilidade, simplicidade, de performance rápida e com alta correlação com os teores de ácido ascórbico e fenólicos totais.

2.5.3 MÉTODO DPPH

O método DPPH, desenvolvido por Brand-Williams, Cuvelier e Berset em 1995, é dos mais usados para verificar a capacidade antioxidante em sequestrar radicais livres, que consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta, que possui absorção muito intensa na região do visível, que pode ser facilmente determinado por espectrofotometria na faixa de 515-520 nm (GOULART et al., 2009; SUCUPIRA et al., 2012).

O radical DPPH na presença de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•) é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) (Figura 12), de

coloração amarela, consequentemente o desaparecimento da banda de absorção, portanto o método monitora o decréscimo da absorção durante a reação (GOULART et al., 2009; SUCUPIRA et al., 2012).

O resultado é determinado pela porcentagem de atividade antioxidante (%DPPH) que é proporcional às concentrações dos antioxidantes, essa concentração que causa a redução da concentração inicial de DPPH por 50% e é definido como EC_{50} (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

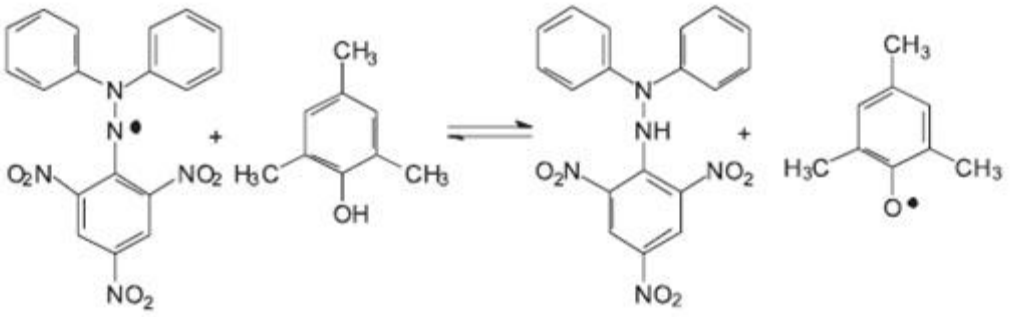


Figura 12 - Reação química entre o antioxidante BHT e o radical DPPH. Fonte: Goulart et al., 2009

Baseado nas diversas pesquisas que indicam que há diversos fatores que podem interferir na composição dos compostos fenólicos dos extratos, como: condições de crescimento da planta, do solo, da preparação da planta para extração, do processo de extração e da metodologia *in vitro* para quantificar e identificar o conteúdo desses compostos (MADSEN; BERTELSEN, 1995). Nesse presente estudo utilizou-se os métodos de determinação da atividade antioxidante por Folin-Ciocalteau, FRAP e DPPH por serem análises mais utilizadas nas pesquisas científicas, para assim, verificar quais desses métodos apresentam melhor correlação com análises de estabilidade oxidativa. Estudo realizado por Capitani et al. (2009) indicam que DPPH e FRAP tem boa correlação com TBARS, entretanto, nenhuma aplicação em produto cárneo foi realizado para confirmação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência antioxidante de extratos naturais comerciais de alecrim e chá verde no controle da oxidação lipídica de um produto à base de carne de frango, durante armazenamento congelado, substituindo totalmente o antioxidante BHA, aplicados em concentrações baseadas em diferentes metodologias de determinação do poder antioxidante.

3.2 Objetivos específicos:

- Verificar o poder antioxidante dos extratos naturais comerciais de alecrim e chá verde em relação ao sintético BHA pelos métodos Folin-Ciocalteau, FRAP e DPPH;
- Elaborar um hambúrguer à base de carne de frango com diferentes concentrações de agentes antioxidantes naturais, calculadas em função do poder antioxidante avaliado pelos diferentes métodos;
- Realizar a caracterização físico-química destes produtos cárneos;
- Avaliar a estabilidade oxidativa dos produtos cárneos, durante armazenamento congelado;
- Comparar, nos hambúrgueres, a eficiência antioxidante de extratos naturais, adicionados nas diferentes concentrações em relação ao BHA, tradicionalmente

utilizado na indústria;

- Avaliar a estabilidade sensorial dos produtos cárneos, durante armazenamento congelado;
- Verificar se há diferença na aceitação sensorial dos hambúrgueres produzidos com antioxidante tradicional BHA ou com antioxidantes os naturais em diferentes concentrações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Para a realização do presente ensaio foram utilizadas carne de frango e pele de frango (fonte lipídica), adquiridas no comércio local. As amostras dos extratos naturais e do antioxidante sintético foram fornecidas pela empresa DuPont™ Danisco, sendo essas:

- Antioxidante sintético: *EMBANOX™ BHA* (butil-hidroxi-anisol), lote: ABH011C039;
- Antioxidante natural *GUARDIAN™ Rosemary Extract 09* [extrato de alecrim (4,0-4,7% diterpenos fenólicos), monooleato de polioxietileno sorbitana e propileno glicol], lote: 1021778707
- Antioxidante natural: *GUARDIAN™ Green Tea Extract 20S* (extrato de chá verde – 20% catequinas – e NaCl), lote: 40115186945.

A composição fenólica dos extratos naturais não foi informada com maior especificidade, na Figura 13 podem-se observar as estruturas descritas nessas

amostras, entretanto, sem sua quantificação.

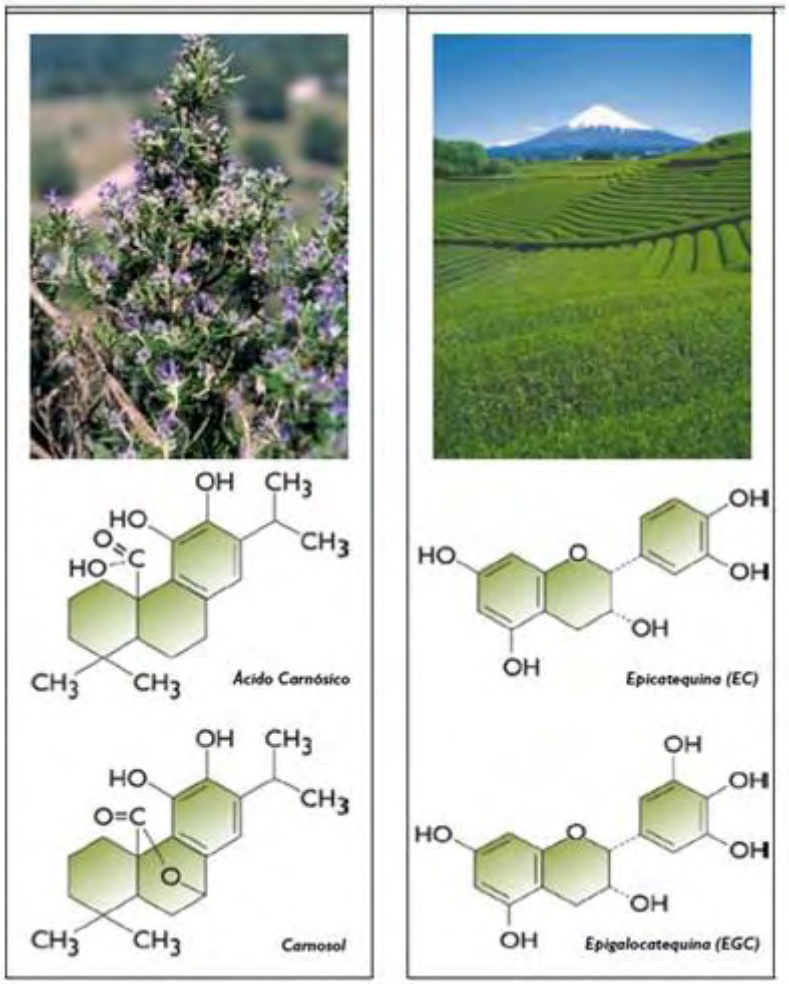


Figura 13 - Estrutura fenólica do extrato de alecrim e extrato de chá verde, respectivamente, das matérias-primas utilizadas. Fonte: Trinderup, 2009.

4.2 Delineamento experimental

Os hambúrgueres de frango foram preparados no laboratório de Análise Sensorial da FZEA. A carne de frango e pele de frango foram trituradas (em um moedor com um disco de moagem de 3mm), após, foram misturas em quantidades proporcionais, juntamente com outros ingredientes e os antioxidantes nos testes

respectivos (Tabela 4). Cada hambúrguer foi pesado entre 95 a 100g e moldado em um equipamento específico de moldagem de hambúrguer, sendo cada unidade separada por folhas de papel vegetal (Figura 14).

Tabela 4 – Formulações dos hambúrgueres de frango.

	%					
	1	2	3	4	5	6
Peito	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
Pele de frango	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Sal	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20
Pimenta branca	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
BHA (ppm)		20				
Chá Verde (ppm)			38	10		
Alecrim (ppm)					480	18,6
Água	3,77	3,768	3,77	3,77	3,72	3,77
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

As dosagens dos antioxidantes foram determinadas conforme resultados de análises do poder antioxidante (Folin-Ciocalteau, FRAP e DPPH) (Tabelas 6, 7 e 8), estipulado como padrão à dosagem máxima permitida do sintético BHA de 0,01% base gordura, portanto 0,002% na massa total (calculado em função da adição de 20% de pele de frango como fonte lipídica), sendo os demais antioxidantes determinados nesse padrão de valor com base em matemática simples. Por exemplo, na análise do extrato chá verde pelo método FRAP o resultado foi 1757,96 µmol Trolox/g de amostra, sendo que do BHA foi 3327,32 µmol Trolox/g, considerou-se então a seguinte regra de três inversa:

1757,96 ——— 100%

3327,32 ——— X

Sendo x = 189,27%, determinou-se que para obter o mesmo poder do antioxidante BHA o extrato chá verde deveria ser dosado 89,27% a mais do que o sintético. Ou seja, 0,002 + 89,27% = 0,0038% (38 ppm). E assim, aplicou-se a mesma regra para os demais testes. Entretanto, tendo em vista do número excessivo de amostras para análises físico-químicas e sensoriais, as dosagens estipuladas pelo método Folin-Ciocalteau foram desconsideradas, uma vez que, os resultados obtidos por esse método apresentaram valores intermediários entre os métodos FRAP e DPPH.

Após o preparo dos produtos, os mesmos foram devidamente identificados por tratamento, congelados e mantidos sob temperatura de -18ºC por um período de 120 dias para a determinação de vida útil. As amostras foram colocadas em descongelamento, sob refrigeração 0 – 2ºC, durante aproximadamente 12 horas, antes das análises descritas e avaliadas nos tempos zero, 30, 60, 90 e 120 dias.

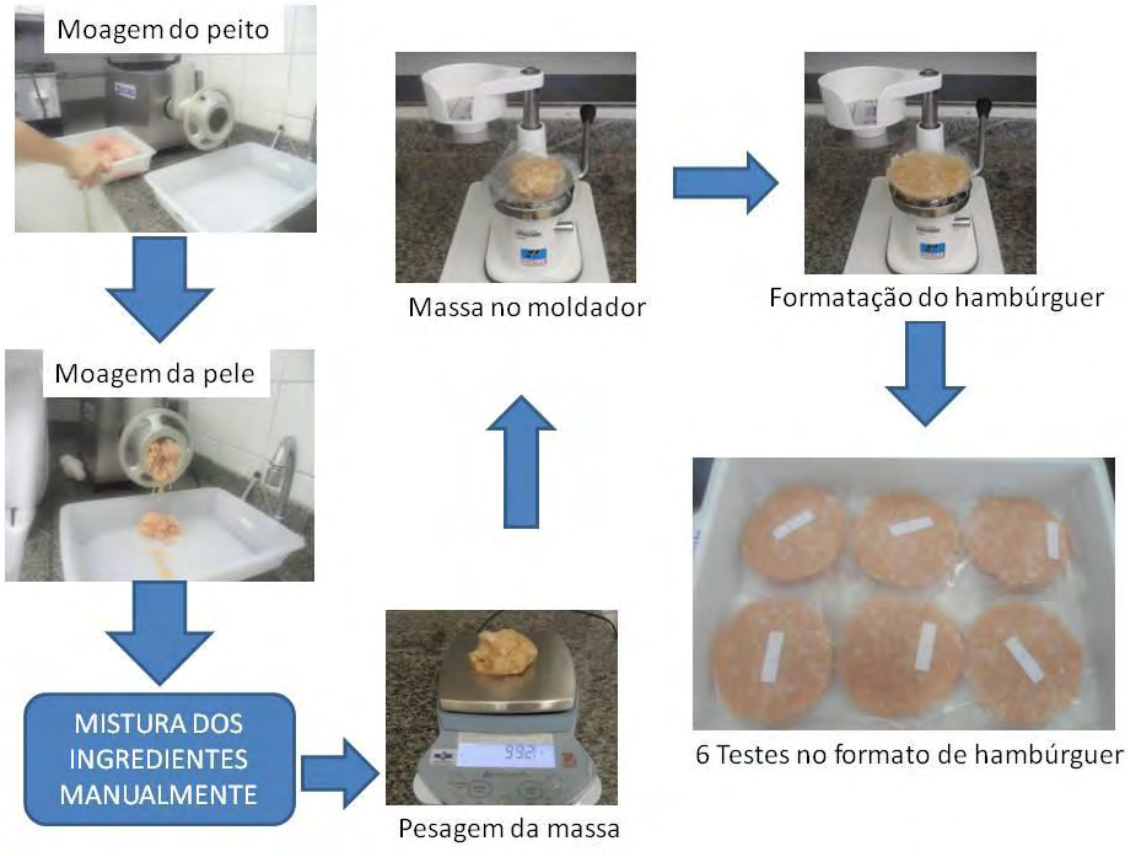


Figura 14 – Processamento das amostras de hambúrguer

Segundo Instrução Normativa do MAPA (MAPA, 2006) somente os antioxidantes sintéticos, como o BHA, tem limite de uso para carnes e produtos cárneos. Para os antioxidantes naturais como chá verde e extrato de alecrim não há legislação vigente.

Atualmente, as empresas de alimentos utilizam extrato de alecrim como aroma, portanto, não há limite de dosagem para seu uso. Por esse motivo, testes preliminares foram realizados para verificar aspecto sensorial dos antioxidantes naturais, sendo aplicado elevadas dosagens desses, utilizando como base 0,10% do antioxidante BHA na base total (Tabela 5) e os resultados das análises de poder antioxidante pelos três métodos Folin-Ciocalteau, FRAP e DPPH, sendo as dosagens determinadas conforme os cálculos descritos anteriormente.

Tabela 5 – Formulações dos hambúrgueres de frango com elevadas dosagens dos antioxidantes

	%						
	1	2	3	4	5	6	7
Peito	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
Pele de frango	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Sal	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Pimenta branca	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
BHA	0,10						
Chá Verde		0,10	0,19	0,048			
Alecrim					1,3	2,4	0,093
Água	3,87	3,87	3,82	3,92	2,67	1,57	3,88
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

4.3 Determinação do poder antioxidante dos extratos naturais comerciais e do BHA

A atividade antioxidante dos diferentes antioxidantes comerciais das fontes naturais extrato de alecrim e chá verde foram comparados com a atividade antioxidante do sintético BHA por quantificação espectrométrica, determinada pelos métodos UV-VIS: Folin-Ciocalteau, FRAP e DPPH.

4.3.1 Determinação do poder redutor (PR) pelo método Folin-Ciocalteau

O ensaio para determinação do poder redutor foi realizado de acordo com Singleton e Rossi Junior (1965) e Georgé et al. (2005) com modificações, no qual adiciona-se 100µL do antioxidante diluído em água e 500µL do reagente de Folin-Ciocalteau (diluído 1/10), marca Merck, aguardou-se 2 minutos e acrescentou-se 400µL de carbonato de sódio (Synth) 7,5%. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos a 50ºC.

O poder redutor (PR) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração com padrões de ácido gálico (0-60 µg/mL) e expressos como mg de EAG por g de antioxidante e determinada a equação (4) da curva de calibração do ácido gálico. Sendo y = absorbância medida a 760 nm, x = concentração de ácido gálico e coeficiente de correlação *R* = 0,998, assim determinado o PR dos antioxidantes avaliados.

$$y = 0{,}015x + 0{,}031 \quad (4)$$

4.3.2 Determinação da atividade antioxidante total pelo FRAP

O método FRAP (poder antioxidante de redução do ferro) foi realizado de acordo com Benzie e Strain (1996) que é baseado na habilidade dos antioxidantes (redutores) em reduzir Fe^{3+} para Fe^{2+} em pH baixo, na presença de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), formando-se o complexo Fe^{2+} / TPTZ de cor azul intensa que pode ser monitorado a 593 nm.

Preparou-se o reagente FRAP a partir da combinação de 100 mL de tampão acetato 300 mM (3,1g de acetato de sódio, Merck, 984mL de água ultra pura e 16mL de ácido acético glacial Synth) 10 mL de uma solução de TPTZ 10 mM (0,0312g de TPTZ Merck diluído com solução HCl 40 mM em balão volumétrica de 10mL) e 10 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM (0,0541g de cloreto férrico Merck diluído em balão volumétrico de 10mL com água ultra pura) , tendo sido utilizado imediatamente após sua preparação.

Para realizar a avaliação pelo método FRAP adicionou-se 3400 µL do reagente FRAP e 100 µL do extrato diluído em água em tubos de ensaio. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro, após as amostras serem incubadas em banho-maria a 37ºC durante 30 minutos, junto com uma amostra branco (substituindo o antioxidante pelo solvente água).

A determinação da atividade antioxidante total (AAT) foi realizada por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração de solução 1000µM de *Trolox* e expressos como µmol de equivalente *Trolox* por g de amostra. Os resultados foram calculados utilizando-se a equação (5) da curva de calibração do *Trolox*. Sendo y = absorbância medida a 593 nm, x = concentração de *Trolox* e coeficiente de correlação *R* = 0,981.

$$y = 0{,}025x - 0{,}015 \quad (5)$$

4.3.3 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH

O teste DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995) baseia-se na redução do radical livre estável 2,2-difenil-1-picriilhidrazil na presença de um antioxidante doador de hidrogênio, incluindo compostos fenólicos. O DPPH, de coloração púrpura quando reduzido passa a ter coloração amarela.

Para determinação da atividade antioxidante total (AAT) pelo método DPPH, preparou-se primeiramente uma solução DPPH 600 µM (0,0072g de DPPH, Merck, em 30 mL de metanol), após se fez uma diluição, em metanol, dessa solução obtendo DPPH 72 µM e adicionou-se 3,15 mL dessa solução e 350 µL do antioxidante diluído de diferentes concentrações em tubos de ensaio. A leitura em espectrofotômetro foi feita em absorbância a 515 nm após as amostras serem incubadas em banho-maria a 25ºC durante tempo de estabilidade necessária a amostra, no escuro (aproximadamente 3 horas), conforme descrito por Ferandes et al. (2013) (Anexo B). Os resultados foram expressos como EC50 (concentração eficiente) na qual é definido como a concentração que inibe 50% da concentração inicial do radical DPPH.

A atividade antioxidante total pela captura do DPPH foi calculada pela equação (6).

$$\%\ de\ inibição\ do\ DPPH = \frac{(Abs\ branco - Abs\ amostra)}{Abs\ branco}\ x\ 100 \qquad (6)$$

Sendo então, o EC50 calculado segundo a fórmula dada nos gráficos de cada antioxidante para definir a concentração necessária para inibir em 50% o radical DPPH (Tabela 6).

Tabela 6 - Equação da reta calculada pela % inibição do DPPH versus Concentração (mg/L)

Antioxidante	**Equação da reta**	**R^2**
BHA	y = 2,0123x + 1,4452	0,9707
Extrato de Alecrim	y = 2,0458 + 4,0626	0,9868
Chá verde	y = 2,7902 + 17,353	0,9614

dv = desvio padrão

4.4 Caracterização Físico-Química dos hambúrgueres

Logo após o processamento dos produtos cárneos, suas características físico-químicas foram avaliadas pelas análises de composição centesimal e pH.

4.4.1 Composição Centesimal

A composição centesimal dos testes de hambúrguer de frango foi realizada, em quintuplicada.

O teor de umidade foi determinado pelo método de secagem em estufa na temperatura de 105ºC por aproximadamente 24 horas e peso constante (AOAC 950.46, 2007).

A quantidade de cinzas ou conteúdo mineral foi determinada com o resíduo obtido na umidade e inserido em mufla a 550ºC durante aproximadamente 96 horas

e peso constante (AOAC 920.153, 2007).

A determinação de proteína foi realizada conforme metodologia *Kjeldahl*, segundo AOAC 981.10 (2007) e Cecchi (2003) com adaptações, esse método determina o Nitrogênio orgânico total. A destilação foi realizada em destilador de nitrogênio (Modelo MA 036, Marca Marconi), sendo que, empregou-se solução padronizada de HCl 0,10 M para quantificação titulométrica.

Para determinação de lipídios foi utilizado o método de extração com solvente a frio Bligh-Dyer (1959) com adaptações, esse método consiste na mistura de três solventes, clorofórmio, metanol e água, promovendo a formação de duas fases distintas, uma de clorofórmio, contendo lipídios e outra de metanol mais água. Nesse presente estudo utilizou-se 2,5 g de amostra úmida, adicionado 25 mL de clorofórmio Synth, 50 mL de metanol Synth e 20 mL de água destilada, como a amostra, mesmo após a adição dos solventes, apresentava-se em forma de emulsão, essa teve que passar por trituração em equipamento Turrax por 1 minuto. Após secagem a massa de lipídios em porcentagem foi determinada.

4.4.2 Avaliação do pH

Análise de pH foi realizado utilizando-se pHmetro manual com eletrodo de penetração, foram medidas 3 pontos de uma mistura de 2 amostras de cada teste, no tempo zero, sendo o resultado a média das três medidas.

4.5 Avaliação da estabilidade durante estocagem

Durante o armazenamento congelado, as amostras foram descongeladas em

temperatura de refrigeração durante aproximadamente 12 horas e realizados análises de rendimento e redução do diâmetro nos tempos zero e 120 dias e também as análises de cor, TBARS e análise sensorial, nos tempos zero, 30, 60, 90 e 120 dias, para avaliação da estabilidade oxidativa das amostras.

4.5.1 Determinação do rendimento e redução do diâmetro por cozimento

O porcentual de rendimento e redução do diâmetro foram determinados através da pesagem antes e após cozimento e a partir da variação do diâmetro da amostra (equações 7 e 8). Para isso, as amostras foram grelhadas a 165ºC, por aproximadamente 4 minutos de cada lado.

$$\%\, rendimento = \frac{Peso\ da\ amostra\ cozida\ x\ 100}{Peso\ da\ amostra\ crua} \quad (7)$$

$$\%\, redução\ do\ diâmetro = \frac{(Diâmetro\ da\ amostra\ crua - Diâmetro\ da\ amostra\ cozida) x 100}{Diâmetro\ da\ amostra\ crua} \quad (8)$$

4.5.2 Determinação instrumental da cor

As medidas de coloração da carne foram realizadas utilizando-se um colorímetro (mod. MiniScan XE, marca Hunterlab), onde o equipamento foi primeiramente calibrado com um padrão branco e outro padrão negro no sistema CIE L* a* b*, avaliando as medidas absolutas das coordenadas de luminosidade (L*), coloração vermelha (a*), e coloração amarela (b*). A avaliação foi realizada em

três diferentes pontos de amostra em duplicata, totalizando seis pontos de medida, sendo o resultado a média das avaliações.

4.5.3 Teste das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)

A aplicação do teste TBA, ou determinação do ácido 2-tiobarbitúrico, representa a quantificação do malonaldeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo. A reação envolve o ácido 2-tiobarbitúrico com o malonaldeído produzindo um composto de cor vermelha.

A análise de TBA foi realizada conforme Vyncke (1975), com modificações. Para análise de TBA foram pesadas aproximadamente 5g da amostra experimental em triplicata em béqueres de 250mL, adicionado 25mL de solução TCA (0,1% do sequestrante EDTA Merck, 0,1% de galato de propila Merck, 7,5% de ácido tricloroacético Merck), realizado agitação mecânica com equipamento Turrax por dois minutos e filtrado. Após, retirou-se 5 mL do filtrado em tubos de ensaio e foi adicionado 5 mL de solução de TBA (0,288% de ácido tiobarbitúrico Merck). As amostras foram deixadas em banho-maria com temperatura de 98ºC durante 40 minutos para ocorrer a reação de TBA com MDA e formação do complexo avermelhado, sendo assim, possível a leitura em espectrofotômetro. Após resfriamento das amostras essas foram analisadas em espectrofotômetro Biospectro a 538 nm, juntamente com amostras branco (TBA + TCA).

Para as análises dos resultados foi determinada curva padrão com solução padrão TEP (tetraetoxipropano Merck) nas concentrações 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 2; 3; 4; e 5 em TCA e TBA, seguindo mesmo procedimento de análise em espectrofotometria das amostras. Os resultados foram expressos em índice de TBARs.

4.5.4 Avaliação Sensorial

Para avaliação sensorial foi utilizado teste de aceitação sensorial com escala hedônica de 9 pontos em relação ao atributo Aceitação Geral (DUTCOSKY, 2007; MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1991).

Os provadores foram recrutados na Academia da Força Aérea (AFA), em Pirassununga – São Paulo, no próprio dia da análise, onde foi fornecido o TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE e ESCLARECIDO (Apêndice A), o qual foi lido e assinado por cada um dos provadores antes da realização das análises. O projeto foi anteriormente avaliado e aprovado pelo Comitê de ética da FZEA/USP (Anexo A). As amostras foram preparadas e realizada a degustação na cozinha experimental da Academia da Força Aérea de Pirassununga (AFA) (Figura 15).

Figura 15 – Cozinha experimental da AFA, local da realização da avaliação sensorial das amostras.

As amostras foram grelhadas a 165ºC, por aproximadamente 4 minutos de

cada lado ou até a temperatura interna atingir 90ºC, as amostras foram identificadas por três dígitos, por bloco completo aleatório, tendo sido entregue a cada provador uma ficha de avaliação (Figura 16) por amostra, juntamente com água e biscoito de água e sal, totalizando 6 amostras com 6 fichas de avaliação.

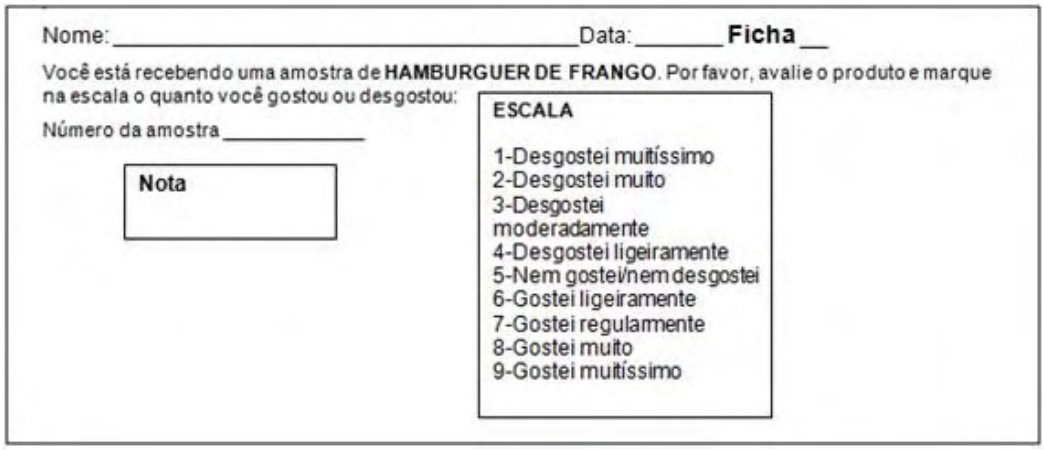


Figura 16 – Ficha de avaliação sensorial das amostras

4.6 Análise dos resultados

Os resultados foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey no nível de significância $p < 0,05$. As análises das variáveis, que foram medidas em aproximadamente 3 repetições em cada amostra experimental, foram realizadas seguindo um modelo de delineamento completamente casualizado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação do poder antioxidante

5.1.1 Determinação do poder redutor pelo método Folin-Ciocalteau

Os resultados das análises de poder redutor pelo método de Folin-Ciocalteau estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Poder redutor (PR) de diferentes antioxidantes comerciais

Amostra	**PR (mg de EAG/g de antioxidante ± dv)**
EMBANOX™ BHA	1476,67[a] ± 33,00
GUARDIAN™ Rosemary Extract 09 (extrato de alecrim)	114,50 [b] ± 0,24
GUARDIAN™ Green Tea Extract 20S (chá verde)	1497,97 [a] ± 19,88

EAG = equivalente de ácido gálico, dv = desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa a $p<0,05$

Os resultados demonstraram que não há diferença ($p > 0,05$) entre as amostras de BHA e chá verde na análise de poder redutor pelo método Folin-Ciocalteau. Contrariamente, Pereira (2009) e Rababah, Hettiarachchy e Horax (2004) obtiveram resultados inferiores de PR de extratos de chá verde, sendo respectivamente, 230,19 mg de EAG/g de amostra e 59,8 mg de EAG/g de amostra.

Segundo Ho et al. (1951), Jhoo (2007) e Schmitz et al. (2005) o extrato de chá verde apresenta quatro diferentes tipos de catequinas com atividade antioxidante, sendo a de maior eficiência a EGCG. Isso demonstra que o tipo de catequina influência diretamente o resultado de capacidade antioxidante do extrato de chá verde.

O extrato de alecrim apresentou valor inferior de PR ($p < 0,05$) em relação aos

demais antioxidantes, o que já poderia ser esperado, uma vez que, segundo o fabricante, esse extrato continha em sua composição de 4 a 4,7% de diterpenos fenólicos e o método de Folin-Ciocalteau detecta os grupos fenólicos presentes no extrato, sendo do chá verde testado de 20%.

No estudo realizado por Rababah, Hettiarachchy e Horax (2004) foi obtido resultado de 92,5 mg de EAG/g de amostra de extrato de alecrim, valor este semelhante ao encontrado. Todavia, Bubonja-Sonje, Giacometti e Abram (2011) testaram um extrato de alecrim comercial contendo 40% de ácido carnósico obtendo valor de 450 mg de EAG/g de amostra, valor superior ao obtido no presente estudo, o que pode ser devido a porcentagem de componentes bioativos na composição do extrato, reafirmando que a concentração dos componentes fenólicos influencia diretamente na determinação do PR por Folin-Ciocalteau.

5.1.2 Determinação da atividade antioxidante total pelo FRAP

Os resultados apresentaram diferença ($p < 0,05$) entre os três antioxidantes avaliados, sendo o de maior AAT o sintético BHA, seguido do chá verde e do alecrim, o qual demonstrou AAT bem inferior aos outros dois (Tabela 8).

Tabela 8 – Atividade antioxidante total (AAT) de diferentes antioxidantes comerciais

Amostra	**AAT (µmol *Trolox*/g de amostra ± dv)**
EMBANOX™ BHA	$3327,32^{a}$ ± 202,15
GUARDIAN™ Rosemary Extract 09 (extrato de alecrim)	$140,88^{b}$ ± 4,08
GUARDIAN™ Green Tea Extract 20S (chá verde)	$1757,96^{c}$ ± 47,14

dv = desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa a p<0,05.

O valor obtido da amostra comercial do extrato de chá verde testado apresenta um grande potencial antioxidante quando comparado com o extrato de alecrim, o que pode ser explicado devido à diferença de componentes fenólicos na composição de cada um deles (20% do chá verde e 4-4,7% do alecrim). Celik et al. (2010) avaliaram o extrato de chá verde extraído em 1:1 de metanol e água e obtiveram o valor de 441 µmol Trolox/g, valor esse extremamente inferior ao valor encontrado na amostra teste presente estudo, o que demonstra uma grande efetividade desse extrato. Segundo Madsen e Bertelsen (1995) o método de extração dos extratos e o tipo de solvente utilizado são os maiores interferentes para quantificar a capacidade antioxidante de extratos naturais.

Para a amostra de extrato de alecrim não foi encontrado resultado pela metodologia FRAP na literatura.

O método FRAP determina o poder antioxidante pela habilidade de redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} em pH baixo. Diferentemente do método Folin-Ciocalteau, que pode superestimar o conteúdo fenólico nos extratos, o FRAP, segundo Thaipong et al. (2006), é o método que menos detecta interferentes na quantificação da capacidade antioxidante sobre a composição fenólica dos extratos.

Quanto ao sintético BHA, esse demonstra, por sua vez, alto valor de AAT no método FRAP, o que já era esperado devido a ser um antioxidante puro e sintético. No estudo realizado por Hossain et al (2008), o BHA apresentou valor de 150 g de *Trolox*/100g, valor superior ao encontrado no presente estudo (equivalente a 83,28 g de *Trolox*/100g).

5.1.3 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH

As concentrações necessárias para inibir em 50% o radical DPPH dos

antioxidantes avaliados estão expressos na Tabela 9.

Tabela 9 - Atividade de inibição do DPPH (EC 50) dos antioxidantes

Antioxidante	**EC 50 (mg/L) ± dv**
BHA	$24,13^{a} \pm 0,018$
Extrato de Alecrim	$22,46^{a} \pm 0,025$
Chá verde	$11,70^{b} \pm 0,017$

dv = desvio padrão

Das amostras testadas o extrato de chá verde apresentou menor média e consequentemente a maior capacidade antioxidante. Rababah, Hettiarachchy e Horax (2004) testaram extrato de chá verde e o resultado foi EC = 70,1 mg/L, valor superior ao encontrado, portanto, baixa efetividade do extrato de chá verde, diferente da amostra deste presente estudo. O que também pode ser devido à concentração e tipo de catequina nas amostras de chá verde, uma vez que, segundo Ho et al. (1951) o tipo de catequina encontrado no chá verde influencia diretamente sua atividade antioxidante, por conter maior número de hidroxilas livres e consequentemente maior estabilidade em relação a fatores externos como luz e calor.

Os valores de DPPH do extrato de alecrim e do BHA foram superiores ao do extrato de chá verde, portanto, apresentaram menor capacidade antioxidante em sequestrar radicais livres. No estudo realizado por Bubonja-Sonje, Giacometti e Abram (2011) o extrato de alecrim apresentou resultado de EC = 28,20 mg/L, resultado próximo ao encontrado no presente estudo. Duarte-Almeida et al. (2006) testaram o antioxidante BHA obtendo o resultado de 25 mg/L de EC50, sendo esse resultado próximo a amostra de BHA encontrado no presente estudo.

Segundo Mamede e Pastore (2004) os antioxidantes são sensíveis à luz em razão das suas duplas ligações alternadas, sendo assim, os extratos podem diminuir

sua efetividade em exposição à luz e calor. Por esse motivo, as amostras de extrato testadas foram reservadas com proteção à luz, entretanto, o método DPPH aplicado foi o que demandou maior tempo de espera, em banho-maria à 25ºC, para determinação em espectrofotometria, comparado com Folin-Ciocalteau e FRAP, o que pode ter interferido nos seus resultados.

Esse pode ser um dos motivos no qual os resultados de DPPH do extrato de alecrim e BHA ficaram superiores ao do chá verde (menor capacidade antioxidante), sendo o chá verde de maior estabilidade a fatores externos. Cuppett, Schnepf e Hall (1996) relatam um estudo sobre a estabilidade dos componentes do extrato de alecrim, evidenciando a conversão do ácido carnósico em carnosol (componente esse de menor capacidade antioxidante), o que foi facilitado pela exposição ao oxigênio, luz e aquecimento.

Thaipong et al. (2006) fizeram um estudo comparando os métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC para estimar a atividade antioxidante dos extratos da fruta de goiaba e concluíram que o método FRAP apresentou melhor reprodutibilidade, simplicidade e performance rápida do que os outros métodos, como DPPH, e também com alta correlação com os teores de ácido ascórbico e fenólicos totais. Por sua vez, o método de Folin-Ciocalteau mede a capacidade de transferência de elétrons dos compostos fenólicos em meio alcalino, e outras substâncias antioxidantes similares aos compostos fenólicos ou açúcares podem interferir nas reações. De acordo com o princípio deste ensaio, o que é primariamente avaliado é a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos e/ou de outros antioxidantes semelhantes presentes naquele extrato, assim, a quantificação de fenóis totais acaba sendo uma avaliação secundária (SINGLETON et al., 1999).

5.2 Testes Preliminares

As amostras preliminares foram submetidas à avaliação sensorial no

Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos em Pirassununga – São Paulo. No entanto, antes da realização desta análise sensorial, uma equipe técnica de cinco pessoas avaliou os hambúrgueres, sendo a amostra teste 7 (teor máximo de 2,4% alecrim) rejeitada por todos da equipe, identificando um forte sabor residual de alecrim, considerado “sabor verde forte”. Assim, tal amostra não foi utilizada no teste com consumidores. Os resultados da avaliação da aceitabilidade estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Média da aceitabilidade da avaliação sensorial dos hambúrgueres no teste preliminar com doses elevadas de antioxidantes naturais

Amostra	**Aceitabilidade Geral**
Teste 1 – 0,10% BHA	$5,03^{c}$
Teste 2 – 0,10% Chá verde	$6,57^{ab}$
Teste 3 – 0,15% Chá verde	$6,59^{ab}$
Teste 4 – 0,048% Chá verde	$6,81^{a}$
Teste 5 – 1,30% Alecrim	$2,76^{d}$
Teste 6 – 0,093% Alecrim	$5,61^{bc}$

Diferentes letras significam diferença entre as amostras ($p < 0,05$)

Os testes 2, 3 e 4 não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$), porém diferiram da amostra com o antioxidante sintético BHA, demonstrando maior aceitabilidade do produto produzido com chá verde em relação ao antioxidante BHA.

O hambúrguer produzido com 0,093% de alecrim obteve aceitabilidade semelhante ao antioxidante sintético BHA, porém, na dosagem de 1,30% de alecrim os consumidores não demonstraram boa aceitabilidade do produto, com média entre 3 (desgostei moderadamente) e 2 (desgostei muito). O que indica que o extrato de alecrim em dosagens elevadas pode interferir na aceitabilidade sensorial dos consumidores.

Estudo realizado por Jongberg et al. (2013) comparando a aplicação de dois extratos comerciais de chá verde e alecrim em dosagens de 0,25% e 1%,

respectivamente, em mortadelas, demonstraram altas notas do atributo amargo para as amostras aplicadas com alecrim, valores de 7,2 e 7,1, sendo o valor máximo de 15 (alta intensidade) e o mínimo 0 (baixa intensidade), e também valor 8,0 para o atributo "*spicy*".

Também foi realizada análise de estabilidade oxidativa pelo método de TBARS para verificar a efetividade desses antioxidantes em doses elevadas. Os resultados, apresentados na Figura 17, demonstram que todos os antioxidantes apresentaram efetividade em retardar o processo de oxidação lipídica nos tratamentos, quando comparados com a amostra sem antioxidante (teste 1).

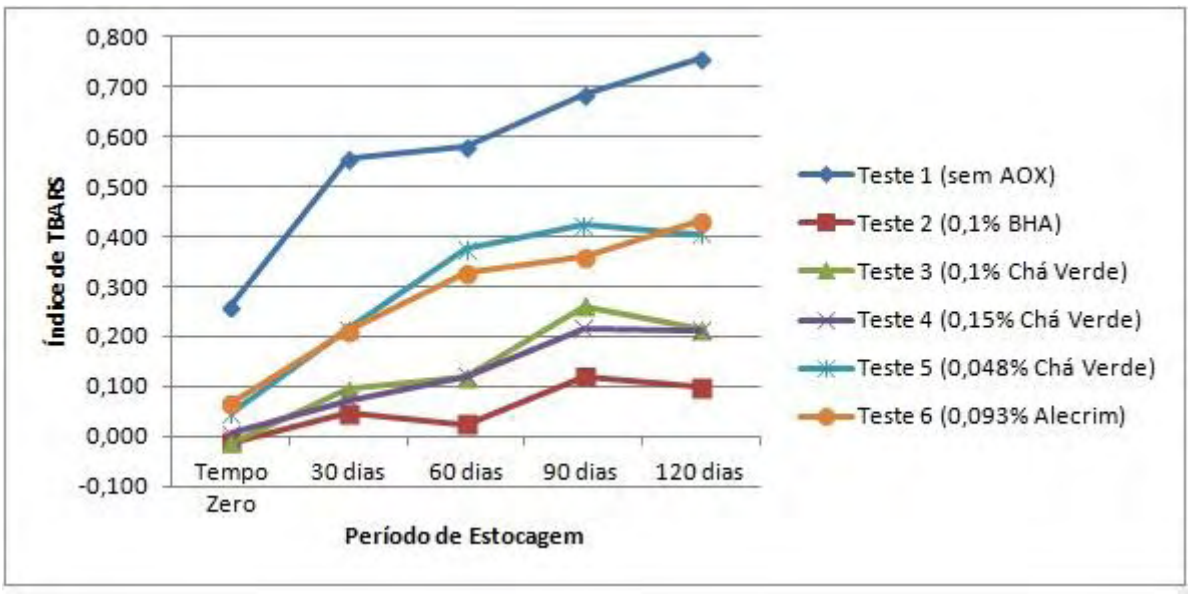


Figura 17 – Valores médios de índice de TBARS das amostras de hambúrgueres com elevada dosagem dos antioxidantes, durante estocagem congelada (-18ºC).

As amostras aplicadas com as maiores concentrações do extrato de chá verde foram as que apresentaram valores de TBARS mais próximos ao sintético BHA, porém ainda superiores, e após as amostras aplicadas com a menor concentração de chá verde e com o extrato de alecrim.

Todas as amostras foram dosadas de acordo com os cálculos das análises de capacidade antioxidante (Folin-Ciocalteau, FRAP e DPPH), sendo assim, todos os antioxidantes naturais deveriam ter apresentado valores similares ao sintético

BHA na análise de oxidação por TBARS, entretanto, houve diferença entre as amostras ($p < 0,05$). Isso demonstra que podem existir interferentes nas análises de capacidade antioxidante, seja pelo próprio método (ver item 5.1) ou outros fatores externos como processo de extração, tipo de plantio etc.

Na comparação de análise de oxidação por TBARS e análises de poder antioxidante nas amostras preliminares, o método FRAP foi o que apresentou melhor reprodução, o qual demonstrou melhor AAT na mesma sequência de melhor estabilidade de oxidação: BHA > Chá verde > Alecrim.

5.3 Caracterização Físico-Química dos Hambúrgueres de Frango

5.3.1 Composição Centesimal

Os resultados das análises de composição centesimal dos hambúrgueres podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11 – Média da composição centesimal das amostras de hambúrguer.

Constituinte	**%**
Cinza	2,21 ± 0,07
Gordura	9,07 ± 0,31
Proteína	18,53 ± 0,20
Umidade	68,99 ± 0,66
Total	98,79

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Hambúrguer do MAPA (MAPA, 2006) o hambúrguer deve conter no máximo 23% de lipídios e no mínimo 15% de proteína o que demonstra que os hambúrgueres estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira.

5.3.2 Avaliação do pH

Os valores de pH das amostras dos hambúrgueres foram determinados somente aos 120 dias de armazenamento e estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Valores de pH das amostras

	pH
Teste 1 (sem antioxidante)	6,03[a]
Teste 2 (20 ppm antioxidante BHA)	6,01[a]
Teste 3 (38 ppm antioxidante extrato de chá verde)	6,00[a]
Teste 4 (10 ppm antioxidante extrato de chá verde)	5,99[a]
Teste 5 (480 ppm antioxidante extrato de alecrim)	5,99[a]
Teste 6 (18,6 ppm antioxidante extrato de alecrim)	5,97[a]

Letras iguais indicam que não há diferença significativa a p>0,05

Os valores de pH obtidos não diferiram (p>0,05) e ficaram próximos de 6,00 nos diferentes tratamentos utilizados, evidenciando que as amostras não sofreram influencia no valor de pH pela adição dos diferentes antioxidantes. Esses resultados ficaram próximos aos valores encontrados por Pereira (2009), que variaram de 6,5 a 6,3, não observando diferença (p > 0,05) na avaliação da estabilidade de diferentes

tratamentos de CMS de frango aplicados com diferentes antioxidantes naturais de chá verde, erva mate, marcela, própolis e o sintético BHA, que foram estocados durante 10 dias sob refrigeração de 0 a 4ºC.

5.4 Avaliação da estabilidade durante estocagem sob congelamento

5.4.1 Rendimento e redução do diâmetro no cozimento

A análise de rendimento das amostras não apresentou diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos, ou tempo de estocagem ou interação tratamento x tempo de armazenamento, apresentando uma média de 75,28%, o que demonstra que os antioxidantes não influenciaram o rendimento do hambúrguer de frango no cozimento.

Os resultados de análise de redução de diâmetro estão apresentados da Tabela 13. Não foi verificada diferença na redução do diâmetro em função do tempo de armazenamento para todos os tratamentos analisados. Por outro lado, verificou-se diferença entre os tratamentos ($p < 0,05$) no tempo zero, mas, no entanto, não diferiram aos 120 dias de estocagem. O maior valor de porcentagem de encolhimento encontrado nas amostras foi de 22,40%, valor esse semelhante ao encontrado por Bertoloni et al. (2011) de 24,23%. E o menor valor obtido foi de 16,03%, valor semelhante a pesquisa de Borba (2010) de 16,0% preparado pelo método de cocção por microondas.

Tabela 13 - Valores médios de redução do diâmetro (%) dos hambúrgueres

Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)			
	0		120	
	Média	DP	Média	DP
T1 (sem antioxidante)	16,03Ab	1,881	18,09Aa	2,524
T2 (20 ppm antioxidante BHA)	18,49Aab	0,870	20,11Aa	0,573
T3 (38 ppm antioxidante extrato de chá verde)	16,66Aab	0,983	19,34Aa	0,509
T4 (10 ppm antioxidante extrato de chá verde)	19,36Aab	0,559	20,31Aa	0,156
T5 (480 ppm antioxidante extrato de alecrim)	16,27Ab	1,280	18,39Aa	1,344
T6 (18,6 ppm antioxidante extrato de alecrim)	20,97Aa	0,771	22,40Aa	0,856

DP = desvio padrão;

Para cada tratamento (teste), média seguida por diferentes letras maiúsculas na mesma linha, diferem significativamente (p≤0.05) Tukey HSD teste;

Para cada tempo de estocagem, médias seguidas por diferentes letras minúsculas, na mesma coluna, diferem significativamente (p≤0.05) Tukey HSD teste.

5.4.2 Cor instrumental

Os resultados da ANOVA para os parâmetros de L* e b* entre os tratamentos não apresentaram diferença significativa, nem ao longo do tempo e também não houve interação entre os tratamentos versus o tempo de vida útil (p > 0,05). A média dos valores de L* ficou entre 45,91 a 51,14 e os valores de b* entre 4,88 e 7,00. Segundo Duarte et al. (2006) a luminosidade (L*) está associada com a quantidade de água no tecido e com a evolução das reações bioquímicas *post mortem* de frangos de cortes e quanto maior o valor de L* mais clara é a carne e valor menor mais escura. As médias de 46,4 a 49,7 são consideradas normais para cor de peito de frango, sendo os valores encontrados nesse presente estudo nessa faixa de valor, uma vez que, 75% da formulação dos hambúrgueres foi de peito de frango.

Ramadhan, Huda e Ahmad (2012) avaliaram a cor de diferentes hambúrgueres, adicionados de polidextrose e sorbitol, sendo que no hambúrguer produzido com carne de frango a média dos valores de L* e b* foram, respectivamente, 38,8 e 18,51, evidenciando um hambúrguer de coloração mais escura e amarela do que as amostras avaliadas nesse experimento. Outro aspecto importante na avaliação dos parâmetros L* e b* é que a quantidade de gordura reduz esses valores, portanto, para questões de comparação, os valores de gordura nos hambúrgueres devem ser observados (BERTOLONI et al., 2011).

Os valores médios do parâmetro de cor a* não apresentaram diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$), nem houve interação tempo x tratamento ($p > 0,05$) o que demonstra que a adição dos antioxidantes naturais não alterou a cor dos produtos cárneos, conforme pode ser verificado na Figura 18. Entretanto, verificou-se diferença ao longo do tempo de armazenamento ($p < 0,05$), sendo que os valores de a*, para todos os tratamentos, reduziram ao longo do tempo e variaram na faixa de -1,00 a -2,00. Essa faixa de variação, apesar de significativa, não representou alterações perceptíveis na aparência do produto cozido, uma vez que, não houve diferença significativa na avaliação sensorial para todos os tratamentos (ver Tabela 14).

Pino (2005) avaliou a cor de cortes de frango durante 9 meses sob congelamento e detectou baixos valores da coloração “vermelha brilhante” (a*) na carne do peito durante todo o período de armazenamento, por ter baixo teor de mioglobina e por ser uma carne considerada de “fibras rápidas”, presentes em músculos adaptados à contrações rápidas e fortes (OLIVO, 2006). A diminuição nos valores de a* também foi evidenciada por Pereira (2009) em carne mecanicamente separada de frango adicionada de antioxidantes naturais ao longo do período de estocagem de 10 dias sob refrigeração de 0 a 4ºC.

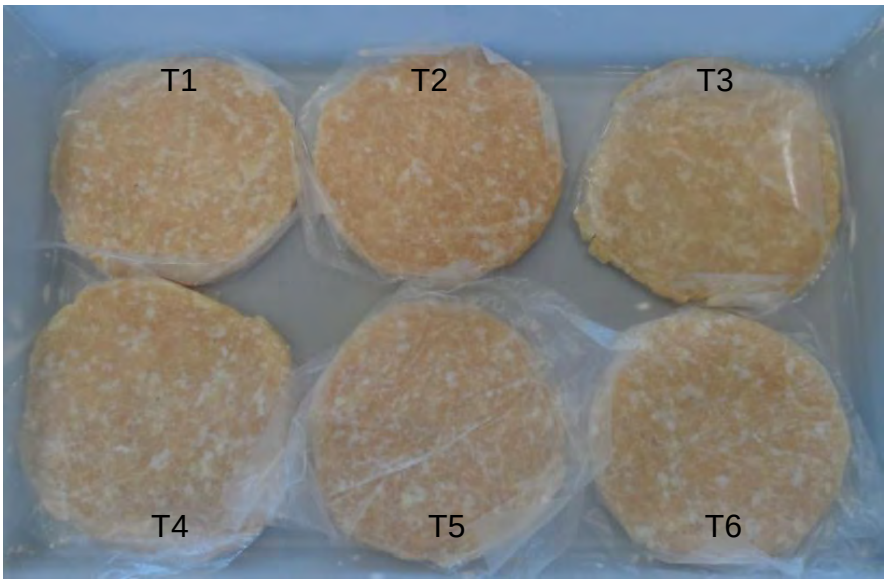


Figura 18 - Testes experimentais das amostras de hambúrguer (T1: Controle; T2: 20 ppm BHA; T3: 38 ppm Chá Verde; T4: 10 ppm Chá Verde; T5: 480 ppm Alecrim; T6: 18,6 ppm Alecrim).

5.4.3 Teste TBARS

Em relação à oxidação lipídica das amostras dos hambúrgueres determinada pelo índice de TBARs evidenciados na Figura 19, verificou-se que houve diferença entre os tratamentos, ao longo do tempo de armazenamento e interação tratamentos x tempo de armazenamento ($p < 0,05$).

A amostra sem antioxidante (T1) foi que apresentou maior oxidação lipídica ao longo do tempo de armazenamento. Após 120 dias de estocagem as amostras com as menores dosagens dos antioxidantes chá verde e alecrim (T4 e T6) não apresentaram diferença com a sem antioxidante (T1) ($p > 0,05$), o que demonstrou baixa efetividade dessas dosagens na preservação da vida útil de hambúrgueres de frango.

Os hambúrgueres aplicados com maiores dosagens dos antioxidantes (T3 e T5) apresentaram diferença significativa do controle sem antioxidante (T1) ($p < 0,05$) após 120 dias de estocagem, evidenciado que essas dosagens são efetivas para

controle da oxidação lipídica dessas amostras, sendo que, a amostra T5 (alecrim) não apresentou diferença significativa com a amostra aplicada com o antioxidante sintético BHA (T2) ($p > 0,05$), observou-se assim, maior efetividade do extrato de alecrim do que do chá verde.

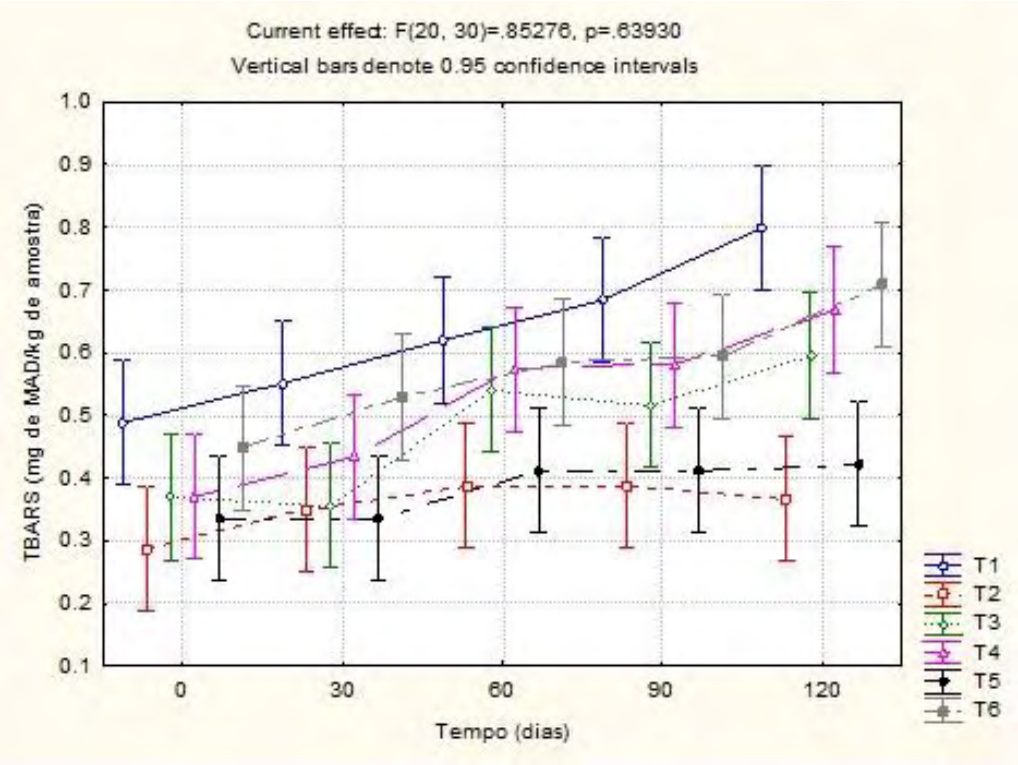


Figura 19 - Valores de TBARs das amostras de hambúrguer de frango ao longo do tempo

T1: Controle; T2: 20 ppm BHA; T3: 38 ppm Chá Verde; T4: 10 ppm Chá Verde; T5: 480 ppm Alecrim; T6: 18,6 ppm Alecrim.

Ferreira et al. (2011) avaliaram a estabilidade oxidativa pelo método de TBARs de hambúrgueres de frango comparando o antioxidante sintético BHT e extrato de erva mate, durante 120 dias, e não observaram diferença significativa entre as amostras com BHT e o extrato natural, sendo os valores de TBARs entre 0,5 e 0,8 mg MDA/kg, valores similares aos encontrados nessa pesquisa. Pesquisa realizada por Devatkal et al. (2012) em hambúrguer de frango com BHT e outros dois extratos(*Curry* e *Fenugreek*,), armazenados por 8 dias a 4ºC, também evidenciaram valores de TBARs abaixo de 1,0 até o 6º dia de estocagem e no 8º dia valores até 1,3 mg MDA/kg, não ocorrendo diferença significativa entre BHT e os

extratos ($p > 0,05$).

Valores de TBARs em carne de frango tratada com extrato de chá verde em diferentes dosagens (0,005%, 0,01%, 0,02% e 0,03%), estocados durante 9 meses na temperatura de -20ºC, foram observados por Tang et al. (2001), sendo que, todas as dosagens apresentaram valores abaixo de 1,0 mg MDA/kg. A amostra com 0,03% foi que demonstrou melhor estabilidade oxidativa com aproximadamente 0,25 mg MDA/kg após 9 meses de estocagem. Extrato de chá verde também foi testado por Pereira (2009) em carne mecanicamente separada de frango e comparado com o antioxidante sintético BHA, as amostras foram estocadas sob refrigeração e os valores de TBARs encontrados com 10 dias foram de 0,183 para o chá verde e 0,177 mg MDA/kg para BHA, valores esses inferiores ao encontrado nesse experimento, o que pode ser explicado devido ao menor período de estocagem, entretanto, os resultados de Pereira evidenciaram que não houve diferença significativa entre o sintético e o extrato de chá verde.

Hernández-Hernández et al. (2009) testaram extrato de alecrim em carne de porco estocada a 4ºC durante 72 horas e determinaram valores de TBARs semelhantes as amostras desse presente estudo, entre 0,566 e 0,722 para amostras com extrato de alecrim, diferindo significativamente da amostra sem antioxidante (1,086 mg MDA/kg),

Amostras comerciais de extrato de alecrim e chá verde também foram testadas por Jongberg et al. (2013) em mortadela, sendo que a amostra aplicada com chá verde apresentou menor valor de TBARs que a amostra com alecrim, contrariando o resultado dessa pesquisa. Entretanto, os testes preliminares indicaram uma melhor estabilidade oxidativa com amostra aplicada com chá verde, isso pode ser explicado devido a dosagem ótima dos antioxidantes, da quantidade e tipo dos compostos fenólicos no extrato.

Nesse presente estudo, e também em outras pesquisas citadas, os valores de TBARs foram inferiores a 1,0 mg MDA/kg, o que é fator extremamente importante à saúde, uma vez que diversos autores indicam que valores altos de TBARs são tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos (TANG et al., 2001). Segundo Terra, Cichoski e Freitas (2006), valores de TBARS acima de 1,59 mg MDA/kg podem causar danos

à saúde do consumidor.

Conforme descrito no item 5.2 todos os antioxidantes naturais foram dosados para apresentar o mesmo poder antioxidante do BHA de acordo com as análises de poder antioxidante, FRAP e DPPH, sendo assim, poder-se-ia esperar que todas as amostras aplicadas com os antioxidantes naturais e o sintético BHA apresentariam resultados similares de oxidação por TBARS, o que não foi evidenciado. Por esse motivo, pode-se descrever a hipótese que o método para determinar a capacidade antioxidante é fator fundamental para determinação da dosagem dos antioxidantes, sendo que, nos resultados avaliados desse experimento pode-se evidenciar que o método FRAP foi o que apresentou melhor reprodutibilidade com a análise de TBARS. Para permitir melhor visualização desta hipotoese, nas Figuras 20 e 21 estão apresentados separadamente, em função do tipo de extrato natural, os resultados de TBARS para os hambúrgueres com BHA e dosi níveis de extrato natural calculados em função do método de análise do poder antioxidante .

Os três métodos utilizados neste trabalho (Folin-Ciocalteau, FRAP e DPPH) tem o mesmo princípio químico de mensurar a capacidade do antioxidante na redução do oxidante pelo método de reação de transferência de elétrons. Entretanto, notou-se que os diferentes métodos têm matrizes diferentes que podem influenciar diretamente no resultado final da análise e consequentemente na quantidade correta a ser dosado no produto final.

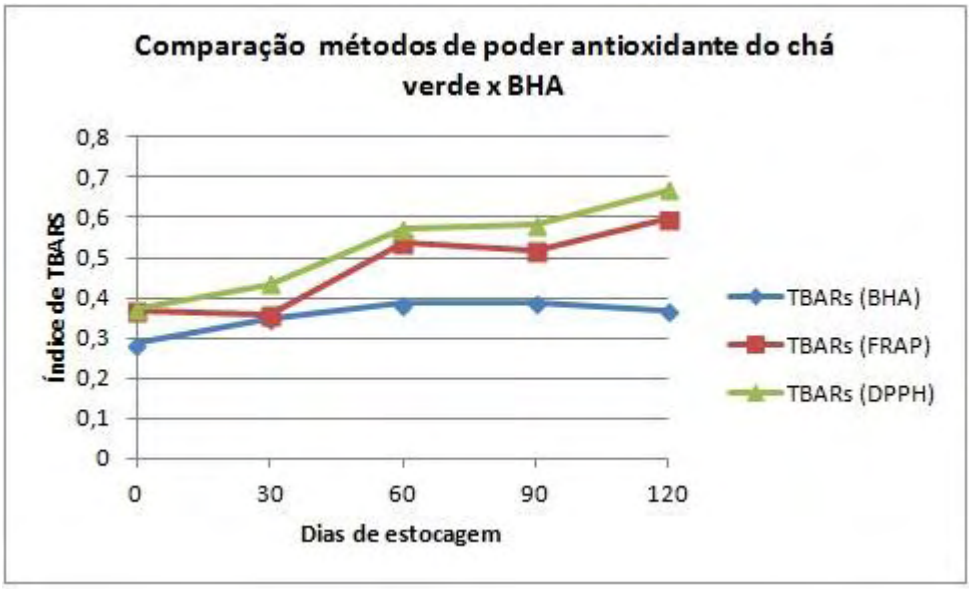


Figura 20 - Comparação dos valores de TBARs com as diferentes dosagens calculadas pelos resultados dos métodos FRAP e DPPH do extrato de chá verde

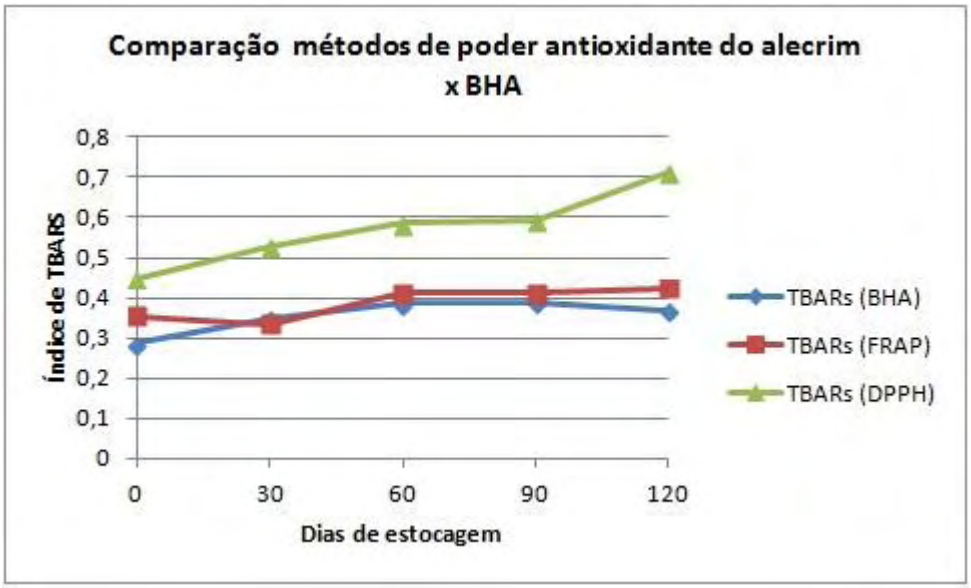


Figura 21 - Comparação dos valores de TBARs com as diferentes dosagens calculadas pelos resultados dos métodos FRAP e DPPH do extrato de alecrim

5.4.4 Avaliação Sensorial

Os resultados da avaliação da aceitação sensorial dos diferentes tratamentos ao longo do tempo de armazenamento congelado estão apresentados na Tabela 14, sendo observado que não houve diferença significativa entre os tratamentos ou ao longo do tempo de armazenamento, nem houve interação tempo x tratamento ($p > 0,05$). Os consumidores atribuíram notas para todas as amostras na faixa de 7,2 e 6,5, ficando próximo na escala hedônica aos termos “gostei regularmente” e “gostei ligeiramente”.

Tabela 14 - Valores médios de aceitação das amostras ao longo do tempo

	Tempo de armazenamento (dias)									
Tratamento	0		30		60		90		120	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T1	7,0Aa	1,47	6,6Aa	1,55	7,0Aa	1,38	7,0Aa	1,52	6,8Aa	1,36
T2	7,2Aa	1,43	6,8Aa	1,47	6,8Aa	1,51	6,6Aa	1,43	6,8Aa	1,50
T3	7,0Aa	1,55	6,9Aa	1,53	7,1Aa	1,22	6,7Aa	1,19	6,7Aa	1,48
T4	7,2Aa	1,25	6,7Aa	1,40	6,8Aa	1,21	6,7Aa	1,32	6,5Aa	1,61
T5	6,7Aa	1,34	6,6Aa	1,64	7,2Aa	1,18	6,7Aa	1,47	6,9Aa	1,14
T6	7,1Aa	1,34	7,0Aa	1,39	6,8Aa	1,35	6,8Aa	1,32	6,9Aa	1,34

DP = desvio padrão;

Para cada tratamento (teste), média seguida por diferentes letras maiúsculas na mesma linha, diferem significativamente ($p \leq 0.05$) Tukey HSD teste;

Para cada tempo de estocagem, médias seguidas por diferentes letras minúsculas, na mesma coluna, diferem significativamente ($p \leq 0.05$) Tukey HSD teste;

T1: Controle; T2: 20 ppm BHA; T3: 38 ppm Chá Verde; T4: 10 ppm Chá Verde; T5: 480 ppm Alecrim; T6: 18,6 ppm Alecrim.

Os resultados indicam que as alterações físico-químicas, principalmente de oxidação lipídica, não influenciaram a aceitabilidade das amostras, mesmo após 120 dias de estocagem. O que condiz com os resultados de TBARs e o estudo de Olivo e

Shimokomaki (2001) que afirmaram que produtos com índice de TBARs menor que 1,0 mg/kg geralmente não apresentam sabores e odores residuais da oxidação lipídica.

Fernandes et al. (2013) avaliaram a aceitabilidade geral de hambúrgueres de ovino adicionados com extratos naturais de orégano e melissa e observaram que não houve diferença entre as amostras ($p > 0,05$), apresentando uma média de aceitação de 6,6. Contrariamente, na pesquisa realizada por Al-Mrazeeq, Al-Abdullah e Al-Ismail (2010) que avaliaram a aceitabilidade de diferentes hambúrgueres ao longo do período de estocagem de 3 meses, o hambúrguer de frango apresentou diferença ($p < 0,05$) ao longo do tempo de armazenamento no atributo de aceitabilidade geral de 6,52 no tempo zero, 6,06 com 1 mês e 5,51 com 3 meses, valores esses inferiores ao desse experimento.

Todavia, Ferreira et al. (2011) avaliaram a adição do extrato natural de erva mate (*Ilex paraguariensis St. Hil*.) em comparação ao sintético BHT na prevenção da oxidação lipídica em hambúrguer bovino durante estocagem de 120 dias, -18ºC. Os resultados mostraram valores de TBARs inferiores a 1,0 mg MDA/kg para as amostras aplicadas com os antioxidantes e todos os hambúrgueres, independente do tipo de antioxidante, também apresentaram boa aceitabilidade, variando de 7,3 e 6,9 na aceitabilidade geral.

O'Neill et al. (1998) afirmam que os aromas de ranço em carnes são inicialmente detectados em valores de 0,5 a 2,0 mg MDA/kg, sendo que, Terra, Cichoski e Freitas (2006) indicam que valores menores que 1,59 mg MDA/kg não são percebidos por análise sensorial.

Os dados do presente estudo e a literatura confirmam que valores de TBARs abaixo de aproximadamente 1,0 mg MDA/kg não são detectadas por consumidores e que antioxidantes naturais, aplicados em baixa dosagem, não interferem no grau de aceitabilidade de hambúrguer de frango, entretanto, a dosagem dos antioxidantes deve ser limitado para não ocorrer rejeição das amostras.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas análises de poder antioxidante dos extratos naturais (chá verde e alecrim) em relação ao antioxidante sintético BHA evidenciaram que os métodos apresentam características e matrizes diferentes demonstrando assim, que as variações são grandes para obter uma boa correlação com as análises de estabilidade oxidativa do produto aplicado.

De acordo com os resultados obtidos as amostras aplicadas com maior dosagem dos extratos naturais apresentaram menores índices de oxidação lipídica, não alterando os aspectos sensoriais do produto. Entretanto, deve-se limitar a dosagem do antioxidante alecrim, uma vez que, a análise sensorial demonstrou rejeição da amostra com excesso desse antioxidante. O extrato comercial de alecrim pode substituir o antioxidante sintético BHA na proporção de 0,01% do sintético para 0,24% de alecrim (base gordura) em hambúrguer de frango e similares, sem alterar suas características físico-químicas ou sensoriais, garantindo sua estabilidade durante período de 4 meses de armazenamento congelado, de forma a garantir um produto mais saudável e *clean label.*

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERLE, E. D. et al. **Principles of meat science**. 4th ed. Dubuque, Iowa: Kendall, Hunt, 2001.

AL-MRAZEEQ, K. M.; AL-ABDULLAH, B. M.; AL-ISMAIL, K. M. Evaluation of some sensory properties and cooking loss of different burger formulations. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, v. 22, n. 2, p. 134- 142, 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of AOAC International**. 18th ed. Gaithersburg: AOAC, 2007.

ASSIS, M. M. M. et al. Processamento e estabilidade de geleia de caju. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 38, n. 1, p. 46-51, 2007.

ALTMANN, H. J. et al. Effects of BHA and related phenols on the forestomach of rats. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 24, n. 10/11, p. 1183-1188, 1986.

ALVES, S. G. T.; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de material colagenoso extraído de pés de frango. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion,** Caracas, v. 52, n. 3, 2002.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p.1-9, 2007.

BANNWART, G. C. M. C.; TOLEDO, M. C. F. Aspectos toxicológicos dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ. **Boletim da SBCTA**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 245-255, jul./dez. 1999.

BARRERA-ARELLANO, D. Estabilidad y utilización de nitrogeno em aceites y grasas. **Grasas y Aceites,** Madrid, v. 49, n. 1, p. 55-63, 1998.

BATISTA, A. S. M.; BESERRA, F. J.; SILVA, E. M. C. Aproveitamento de carne caprina de animais de descarte na formulação de um embutido cru tipo hambúrguer. **Higiene Alimentar,** Mirandópolis, v. 19, n. 136, p.13-16, out. 2005.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the frap assay. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERAQUET, N. J. Transformações na cor da carne in natura. In: SEMINÁRIO E CURSO TEÓRICO E PRÁTICO DE PROCESSAMENTO DA CARNE BOVINA, 2010, Campinas. **Anais...** Campinas: Centro de Tecnologia de Alimentos: 2010.

BERGER, K. G. Practical measures to minimize rancidity in processing and storage. In: ALLEN, J. C.; HAMILTON, R. J. **Rancidity in food**. 3th ed. UK: Chapman & Hall, 1994. cap. 4, p. 68-83.

BERTOLONI, W. et al. Utilização de proteínas plasmáticas em hambúrgueres bovinos com diferentes teores de gordura. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal,** Salvador, v. 12, n. 3, p. 563-572, 2011.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 18, p. 911-917, 1959.

BORBA, C. M. **Avaliação físico-química de hambúrguer de carne bovina e de frango submetidos a diferentes processamentos térmicos**. 2010. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Nutrição) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

BOTTERWECK, A. A. M. et al. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the nertherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 38, p. 599-605, 2000.

BRAGAGNOLO, N. Aspectos comparativos entre carnes segundo a composição de ácidos graxos e teor de colesterol. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA, 2., 2001, Concórdia. **Anais...** Concórdia, 2001. p. 393-402.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELLER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method

to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology,** London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRANEN, A. L. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, Heidelberg, v. 52, p. 58-63, Feb. 1975.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico – aditivos alimentares definições, classificação e emprego. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 out. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e qualidade de hambúrguer. Instrução Normativa nº 20, de 31 julho de 2000. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 ago. 2000. Seção 1, p. 7-12.

BRASIL. Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988; Aprovar a revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais do Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965, publicada no **Diário Oficial da União,** Brasília, DF, 19 dez. 1988. Seção 1.

BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources compounds, mechanisms of action, and potential application. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 221-247, 2011.

_____. Instrução Normativa MAPA nº 51, de 29 de dezembro de 2006. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 4 jan. 2007.

BUBONJA-SONJE, M.; GIACOMETTI, J.; ABRAM, M. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 127, p.1821-1827, 2011.

CAMPOS, G. C. M.; TOLEDO, M. C. F. Determinação de BHA, BHT e TBHQ em óleos e gorduras por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 3, p. 65-71, 2000.

CAPITANI, C. D. et al. Evaluation of natural and synthetic compounds according to their antioxidant activity using a multivariate approach. **Eur. J. Lipid Sci. Technol**., v. 11, p. 1090-1099, 2009.

CASTRO, W. F. **Avaliação do efeito protetor do colorífico como antioxidante natural na oxidação lipídica em carne de frango**. 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2008.

CECCHI, H. M**. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003.

CELIK, S. E. et al. Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. **Talanta,** Amsterdam, v. 81, p. 1300-1309, 2010.

CHEN, C.; PEARSON, A. M.; GRAY, J. I. Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 43, p. 177-183, 1992.

CHEN, H.; HO, C. Comparative study on total polyphenol content and total antioxidant activity of tea (Camellia sinensis). In: SHAHIDI, F.; HO, C. **Antioxidant measurement and applications**. Washington DC: ACS Symposium, 2007. cap. 14, p.195-213. (ACS Symposium Series, 956).

CHIZZOLINI, R.; NOVELLI E.; ZANARDI, E. Oxidation Traditional Mediterranean Meat Products. **Meat Science**, v. 49, n. 1, p. 587-599, 1998.

CONACHER, H. B. S. Levels of BHA and BHT in human and animal adipose tissue: interspecies extrapolation. **Food and Chemical Toxicology,** Kidlington, v. 24, n. 10/11, p. 1159-1162, 1986.

CONNING, D. M.; PHILLIPS, J. C. Comparative metabolism of BHA, BHT and other phenolic antioxidants and its toxicological relevance. **Food Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 24, n. 10/11, p. 1145-1148, 1986.

COPPEN, P. P. The use of antioxidants. In: ALLEN, J. C.; HAMILTON, R. J. **Rancidity in food**. 3. ed. UK: Chapman & Hall, 1994. cap. 5, p. 85-103.

CRUZ, A.G. et al. Análise de sobrevida e estudos de vida de prateleira de iogurte probiótico sabor morango. In: SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO EM ANÁLISE SENSORIAL, 4., 2010, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Centro Universitário Senac, 2010.

CUPPET, S.; SCHNEPF, M.; HALL C. Natural antioxidants – Are they a reality? In: SHAHIDI, F. **Natural antioxidants:** chemistry, health effects, and applications. United States of America: AOCS Press, 1951. cap. 2, p.12-23.

DEVATKAL, S. K. et al. Comparative antioxidant effect of aqueous extracts of curry leaves, fenugreek leaves and butylated hydroxytoluene in raw chicken patties. **Journal of Food Science and Technology,** New Delhi, v. 49, n. 6, p. 781-785, 2011.

DRUMM, T. D.; SPANIER, A. M. Changes in the content of lipid autoxidation and sulfur-containing compounds in cooked beef during storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 39, n. 1, p. 336-343, 1991.

DUARTE, K. F. et al. Efeito dos níveis de energia e programas de alimentação sobre a qualidade de carcaça e desempenho de frangos de corte abatidos tardiamente. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 29, n. 1, p. 39-47, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v. 26, n.2, p. 446-452, abr./jun. 2006.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 2. ed. Curitiba: Champagnat, 2007.

ELDIN, A. K. Methods to determine the extend of lipid oxidation in foods. In: DECKER, E. A.; ELIAS, R. J.; McCLEMENTS, D. J. **Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications:** understanding mechanisms of oxidation

and antioxidant activity. UK: WP Limited, 2010. v. 1, cap. 8, p. 181-185.

ESTELLER, M. S.; ORLANDI, L.; LANNES, S. C. S. Color measurement in hamburger buns with fat and sugar replacers. **LWT – Food Science and Technology,** London, v. 39, p. 184-187, 2006.

FERNANDES, R. P. P. et al. Sensory acceptance of lamb burger prepared with natural antioxidants. In: INTERNATIONAL CONGRESSO F MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 59., 2013, Izmir, Turkey. **Abstracts...** Izmir, Turkey, 2013.

FERRARI, R. A.; KOLLER, F. R. Fracionamento de gordura de frango. **Publicatio UEPG Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrária e Engenharias,** Ponta Grossa, v. 7, n. 1, p. 43-51, 2001.

FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais patológicas. **Revista Nutrição,** Campinas, v. 11, n. 1, p. 3-14, jan./jul. 1998.

FERREIRA, E. L. et al. Natural antioxidant from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis St. Hil.*) prevents hamburger peroxidation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 4, p. 803-809, 2011.

FLIEDER, F. J.; ORTHOEFER, F. T. Metals in soybean oil. **Journal of American Oil Chemists Society,** Heidelberg, v. 58, n. 3, p. 270-272, 1981.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry,** Bethesda, v. 73, p. 627-650, 1927.

GEORGÉ, S. et al. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p.1370-1373, 2005.

GOULART, M. O. F. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova,** São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

GOUVEIA, D. S. et al. Avaliação físico-química e teste de aceitação sensorial do

suco de pinha e do blend pinha-leite. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 8, n. 2, p. 127-133, 2006.

GUILLÉN-SANS, R.; GUZMÁN-CHOZAS, M. The Thiobarbituric Acid (TBA) reaction in foods: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 38, n. 4, p. 315-330, 2010.

HE, Y.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of green tea and its catechins in a fish meat model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 45, p. 4262-4266, 1997.

HERNANDES, N. K. et al. Testes de aceitação da beterraba vermelha (Beta vulgaris SSP. Vulgaris L.), cv. Early Wonder, minimamente processada e irradiada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, n. 27, supl., p. 64-68, ago. 2010.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E. et al. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. **Meat Science**, Amsterdam, v. 81, p. 410-417, 2009.

HO, C.T. et al. Natural antioxidants from tea. In: SHAHIDI, F. **Natural antioxidants:** chemistry, health effects, and applications. United States of America: AOCS Press, 1951. cap. 12, p. 213-221.

HUALLANCO, M. B. A. **Aplicação de um sistema de classificação de carcaças e cortes e efeito após abate da qualidade de cortes de frango criados no sistema alternativo**. 2004. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

ITO, N. et al. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. **Journal of the National Cancer Institute,** Oxford, v. 70, n. 2, p. 343-352, 1983.

IVERSON, F. Phenolic antioxidants: health protection branch studies on butylated hydroxyanisole. **Cancer Letters**, Shannon, v. 93, p. 49-54, 1995.

JACOBSEN, C. Understanding and reducing oxidative flavor deterioration in foods. In: DECKER, E. A.; ELIAS, R. J.; McCLEMENTS, D. J. **Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications:** understanding mechanisms of oxidation and antioxidant activity. UK: WP Limited, 2010. v. 1, cap. 6, p. 122-137.

JHOO, J. Antioxidant and anti-cancer activities of green and black tea polyphenols. In: SHAHIDI, F.; HO, C. **Antioxidant Measurement and Applications**. Washington DC: ACS Symposium, 2007. Cap. 15, p. 215-223. (ACS Symposium Series, 956).

JONGBERG, S. et al. Effect of green tea or rosemary extract on protein oxidation in Bologna type sausages prepared from oxidatively stressed pork. **Meat Science**, Amsterdam, v. 93, p. 538-546, 2013.

KARPINSKA, M.; BOROWSKI, J.; DANOWSKA-OZIEWICZ, M. The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 72, p. 5-9, 2001.

KARRE, L.; LOPEZ, K.; GETTY, K. J. K. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Science**, Amsterdam, v. 94, p. 220-227, 2013.

KIRKPATRICK, D. C.; LAUER, B. H. Intake of Phenolic Antioxidants from Foods in Canada. **Food Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 24, n. 10/11, p. 1035-1037, 1986.

LAWRIE, R. A. **Ciência da carne**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

MADSEN, H. L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science and Tecnology**, London, v. 6, n. 8, p. 271-277, Ago. 1995.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 233-252, jul./dez. 2004.

MARIUTTI, L. R. **Efeito da adição de salvia e alho na oxidação lipídica em carne de frango**. 2009. 186 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2009.

MATTIETTO, R. A; LOPES, A. S.; MENEZES, H. C. Estabilidade do néctar misto de cajá e umbu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 456-463, jul.-set. 2007.

MEILGAARD, M. C.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. Boca Raton: CRC Press, 1991.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MORALES, R. et al. Beef acceptability and consumer expectations associated with production systems and marbling. **Food Quality and Preference**, Kidlington, n. 29, p. 166-173, 2013.

MOREIRA, P. A.; MANCINI FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição,** Campinas, v. 17, n. 4, p. 411-424, out./dez. 2004.

MORRISSEY, P. A. et al. Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 73-86, 1998.

MULLER, A. T.; PASCHOAL, E. C.; SANTOS, J. M. G. Impacto do manejo pré-abate na qualidade da carne de frango. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Maringá, v. 5, n. 1, p. 61-80, jan./abr. 2012.

NASCIMENTO, D. C. F.; LOGUERCIO, A. P.; CAMARGO, L. Caracterização do consumidor de carne de frango da cidade de Porto Alegre. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 253-258, jan./fev. 2007.

NUNES, T. P. **Efeito da pré-cura na estabilidade microbiológica de carne mecanicamente separada e elaboração de um produto reestuturado com filés**

de peito de galinhas de descarte. 2003. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

OLIVO, R. Alterações oxidativas em produtos cárneos. In: OLIVO, R. et. al. **O mundo do frango**. São Paulo: Rubison Olivo, 2006. cap. 44, p. 533-542.

OLIVO, R.; SANTOS, M.N.; FRANCO, F. O. Carne de Frango e Nutrição. In: OLIVO, R. et. al. **O mundo do frango**. São Paulo: Rubison Olivo, 2006. Cap. 55, p.672-673.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. **Carnes no caminho da pesquisa**. Cocal do Sul: Imprint, 2001.

O’NEILL, L. M. et al. Comparison of effects of dietary olive oil, tallow and vitamin E on the quality of broiler meat products. **British Poultry Science**, Oxfordshire, v. 39, p. 365-371, 1998.

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

PEREIRA, M. G. **Aplicação de antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de ave**. 2009. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2009.

PINO, L. M. **Estabilidade oxidativa da carne de frangos alimentados com diferentes fontes lipídicas, armazenada sob congelamento**. 2005. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

QUEIROZ, Y. U. et al. Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico químicas de hambúrgueres com reduzidos teores de gordura e de colesterol. **Revista Nacional de Carne**, São Paulo, n. 338, abr. 2005.

RABABAH T. M.; HETTIARACHCHY, N. S.; HORAX, R. Total phenolics and

antioxidant activities of Fenugreek, Green Tea, Black Tea, Grape Seed, Rosemary, Gotu Kola, and Ginkgo extracts, vitamin E, and Tert-Butylhydroquinone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 5183-5186, 2004.

RAMADHAN, K.; HUDA, N.; AHMAD, R.; Physicochemical and sensory characteristics of burger made from duck surimi-like material. **Poultry Science,** Cary, v. 91, p. 2316-2323, 2012.

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

RANKEN, M.D. Rancidity in meats. In: ALLEN, J. C.; HAMILTON, R. J. **Rancidity in food**. 3. ed. UK: Chapman & Hall, 1994. cap. 11, p. 191-201.

ROMANS, J. et al. **The meat we eat**. 12th ed. Iilinois: The Inter-State Printers and Publishers, 1985.

ROSSELL, J. B. Measurement of rancidity. In: ALLEN, J. C.; HAMILTON, R. J. **Rancidity in food**. 3. ed. UK: Chapman & Hall, 1994. cap. 2, p. 30-33.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **EMBRAPA**: comunicado técnico, Fortaleza, 2006.

SANFELICE, C. et al.; Composição química e teor de colesterol da carne de peito de matrizes pesadas em final de ciclo de produção. In: ZOOTEC, 1., 2009, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: Associação Brasileira de Zootecnistas FZEA/USP, 2009.

SCHLINDWEIN, M. M.; KASSOUF, A. L. Análise da influência de alguns fatores socioeconômicos e demográficos no consumo domiciliar de carnes no Brasil**.** **Revista de Economia e Sociologia Rural,** Rio de Janeiro, v. 44, n. 3, p. 549-572, 2006.

SCHMITZ, W. et al. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. **Semina:**

Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 26, n. 2, p. 119-130, jul./dez. 2005.

SCHNEIDER, J. P.; OLIVO, R. Influências na cor da carne de peito. In: OLIVO, R. et. al. **O mundo do frango**. São Paulo: Rubison Olivo, 2006. cap. 21, p. 273-279.

SEBRANEK, J. G. et al. Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. **Meat Science**, Amsterdam, v. 69, p. 289-296, 2005.

SELANI, M. M. **Extrato de bagaço de uva como antioxidante natural em carne de frango processada e armazenada sob congelamento**. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SHAHIDI, F.; HO, C. **Antioxidant measurement and applications**. Washington DC: ACS Symposium, 2007. (ACS Symposium Series, 956).

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U. N. Measurement of lipid oxidation and evaluation of antioxidant activity. In: SHAHIDI, F. **Natural antioxidants:** chemistry, health effects, and applications. United States of America: AOCS Press, 1951. cap. 24, p. 379-395.

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.

SINGLETON, B. V. L. et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. **Methods in Enzymology**, Maryland Heights, v. 299, p. 152-179, 1999.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JUNIOR, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, jan. 2002.

SOARES, D. J. et al. Processos oxidativos na fração lipídica de alimentos. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 30, n. 2, p. 263-272, jul./dez. 2012.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos**. UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde,** Londrina, v. 14, n. 4, p. 263-9, 2012.

TANG, S. Z. et al. Antioxidative effect of dietary tea catechins on lipid oxidation of long-term frozen stored chicken meat. **Meat Science**, Amsterdam, v. 57, p. 331-336, 2001.

TEIXEIRA, L.V. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Santa Terezinha, v. 366, n. 64, p. 12-21, jan./fev. 2009.

TERRA, N. N.; CICHOSKI, A. J.; FREITAS, R. J. S. Valores de nitrito e TBARS durante o processamento e armazenamento da paleta suína curada, maturada e fermentada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 965-970, 2006.

THAIPONG, K. et al. Comparasion of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, Maryland Heights, v. 19, p. 669-675, 2006.

TIRITAN, M. G.; BEUX, S. Controle da qualidade do óleo de soja degomado. **Synergismus Scyentifica UTFPR**, Pato Branco, v. 1, n.1-4, p. 306-316, 2006.

TRINDERUP, R. A. Benefícios dos extratos naturais na estabilidade oxidativa de margarinas. **Aditivos e Ingredientes.** São Paulo, 2009. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/131.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2013.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). **Relatório anual, 2013.** Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubavefnovo/publicações_relatoriosanuais.php>. Acesso em: 24 de abr. 2013.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. **Tabela brasileira de composição de alimentos**: TACO. 4. ed. Campinas: NEPA-Unicamp, 2011.

VALENCIA, I. et al. Enhancement of the nutritional status and quality of fresh pork sausages following the addition of linseed oil, fish oil and natural antioxidants. **Meat Science,** Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 1046-1054, 2008.

VANDGHANOONI, S. et al. Cytotoxicity and DNA fragmentation properties of butylated hydroxyanisole. **DNA and Cell Biology**, New Rochelle, v. 32, n. 3, p. 98-103, 2013.

VENTURINI, K. S. V.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. Características da carne de frango. **Boletim Técnico da Universidade Federal do Espírito Santo**, Espírito Santo: PIE-UFES, 2007.

VILLANUEVA, N. D. M.; TRINDADE, M. A.; Estimating sensory shelf-life of chocolate and carrot cupcakes using acceptance tests. **Journal of Sensory Studies**, Hoboken, v. 25, n. 2, p. 260-279, 2010.

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

WISCHRAL, D. et al. Desenvolvimento de protocol para elaboração de presunto de frango e avaliação da qualidade. In: SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO EM ANÁLISE SENSORIAL, 4., São Paulo. **Anais...** São Paulo: Centro Universitário Senac, 2010.

YU, L. et al. Rosemary extract as inhibitors of lipid oxidation and color change in cooked turkey products during refrigerated storage. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 67, n. 2, 2002.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de consentimento livre e esclarecido

Consentimento formal de participação no projeto de pesquisa: **"**Avaliação sensorial de hambúrguer de frango adicionado de antioxidantes naturais**".**

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ CEP: _____ Fone: _____

Justificativa:A oxidação lipídica está relacionada a diversas propriedades organoléticas, como aroma, coloração, textura, suculência, estabilidade das proteínas e vida de prateleira. A presença de antioxidantes retardam a oxidação lipídica de produtos como os produtos cárneos, porém muitos antioxidantes são “vistos” pelos consumidores como produtos químicos e por essa razão a busca por produtos “naturais” tem aumentado bastante.

Objetivos do projeto: Comparar e avaliar o “poder” antioxidante das fontes naturais na substituição total dos antioxidantes eritorbarto de sódio e BHA em reestruturado de carne frango.

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:

- Sessenta provadores farão a avaliação sensorial dos produtos.
- Serão testadas formulações de hambúrguer de frango com diferentes composições.
- O provador deverá avaliar (olhar, cheirar, provar) 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 e o processo de fabricação será realizado de acordo com as normas de Boas Práticas de Fabricação.
- Em função do exposto no item anterior, não há **previsão de indenização em decorrência da participação neste projeto.**
- Os testes para avaliação sensorial dos hambúrgueres, nos quais os provadores experimentarão os produtos desenvolvidos **serão acompanhados** pela aluna proponente (Manoela Alves Pires).
- Quaisquer outros esclarecimentos poderão ser solicitados antes, durante e após a pesquisa.

Eu,_____, RG _____, CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **"**Avaliação sensorial de hambúrguer de frango adicionado de antioxidantes naturais” e declaro não possuir qualquer tipo de problema alimentar.

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: Manoela Alves Pires– Química Bacharel
Contato: manoela.alvespires@hotmail.com
Fone: (19) 3565-3515

Pirassununga, _____ de _____ de _____.
Assinatura: _____

ANEXO A

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA USP

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação sensorial de hambúrguer de frango adicionado de antioxidantes naturais

Pesquisador: Manoela Alves Pires
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 07694312.6.0000.5422
Instituição Proponente: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 122.195
Data da Relatoria: 26/09/2012

Apresentação do Projeto:
O projeto apresenta-se bem elaborado e com apresentação coerente a proposta.

Objetivo da Pesquisa:
Os objetivos estão bem definidos, e corretamente destacados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Não há riscos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
A possibilidade de uso de antioxidantes naturais é absolutamente plausível e deve ser incentivada, a fim de que possamos substituir os atuais antioxidantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
NDN

Recomendações:
NDN

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Não há pendências.

Situação do Parecer:
Aprovado

Endereço: Avenida Duque de Caxias Norte, 225
Bairro: Campus Universitário da USP **CEP:** 13.635-900
UF: SP **Município:** PIRASSUNUNGA
Telefone: (19)3565-4299 **Fax:** (19)3565-4114 **E-mail:** gholena@usp.br

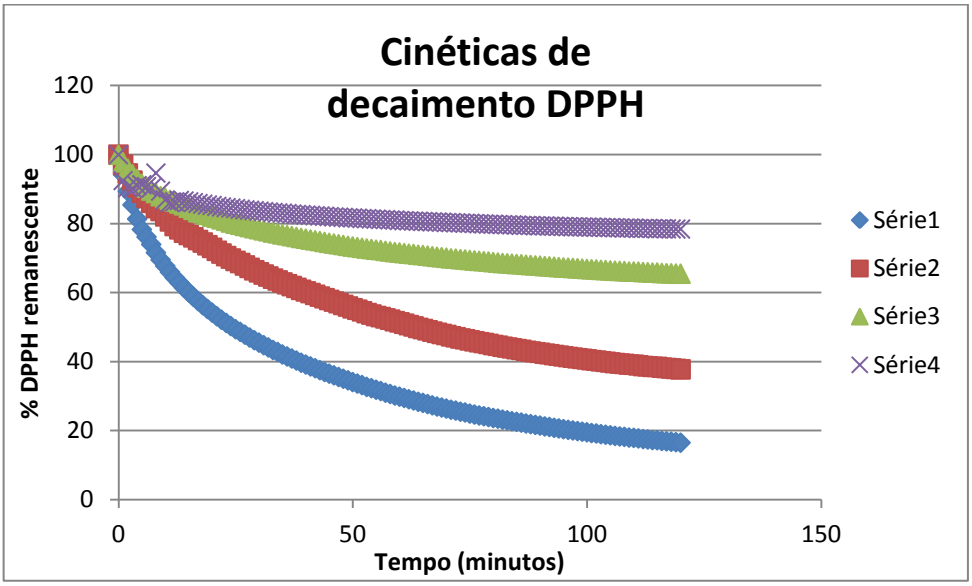
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA USP

Plataforma Brasil

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Considerações Finais a critério do CEP:
Projeto aprovado por unanimidade de votos.

PIRASSUNUNGA, 15 de Outubro de 2012

Assinador por:
Daniele dos Santos Martins
(Coordenador)

ANEXO B – Cinética de decaimento do método DPPH de extrato natural de orégano, avaliado por Fernandes et al. (2013)