UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RAFAELLA DE PAULA PASETO FERNANDES

USO DE EXTRATOS ANTIOXIDANTES NATURAIS OBTIDOS DE
ERVAS AROMÁTICAS NA ELABORAÇÃO DE PRODUTOS A BASE DE
CARNE OVINA

Pirassununga

2015

RAFAELLA DE PAULA PASETO FERNANDES

USO DE EXTRATOS ANTIOXIDANTES NATURAIS OBTIDOS DE
ERVAS AROMÁTICAS NA ELABORAÇÃO DE PRODUTOS A BASE DE
CARNE OVINA
(versão corrigida)

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

Área de concentração: Ciências da
Engenharia de Alimentos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mariza Pires de Melo
Co-orientador: Prof.^o Dr.^o Marco Antonio
Trindade

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

F363u	<p>Fernandes, Rafaella de Paula Paseto</p> <p>Uso de extratos antioxidantes naturais obtidos de ervas aromáticas na elaboração de produtos a base de carne ovina / Rafaella de Paula Paseto Fernandes. -- Pirassununga, 2015.</p> <p>253 f.</p> <p>Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Ciências Básicas.</p> <p>Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Mariza Pires de Melo.</p> <p>1. Atmosfera modificada 2. Especiarias 3. Estabilidade 4. Hambúrguer 5. Linguiça 6. Saudabilidade. I. Título.</p>
-------	--

Dedico este trabalho às pessoas mais valiosas da minha vida:

*À minha mãe Irma, ao meu irmão Heberty por
estarem sempre ao meu lado...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço todo o apoio das pessoas queridas que sempre estão ao meu lado de alguma maneira me auxiliando para vencer os obstáculos e me estimulando constantemente para nunca desistir de meus sonhos...

À minha mãe, Irma, pelo valioso exemplo de vida, por ser uma mulher guerreira e vitoriosa a quem devo tudo o que sou hoje; por me ensinar que sozinhos não somos nada e que nunca podemos desistir não importa o que aconteça, pois Deus sempre sabe o que faz;

Ao meu irmão Hebert, por ser o verdadeiro milagre de Deus que me fez ser forte para aguentar cada dia de angústia que passamos ao seu lado para aprender a ter muita paciência acima de tudo... porque o que tiver que ser será e não adianta ter pressa porque temos que passar por situações boas e ruins para valorizarmos a única vida que temos e as pessoas que amamos verdadeiramente e que estão sempre torcendo por nós...;

Ao Tharlys Eduardo São Pedro pela grande paciência, apoio e compreensão;

Às palavras e sabedoria do Senhor Roberto Butteri (in memorian) SEMPRE, porque sem esta pessoa tão especial que surgiu em minha vida com certeza não teria escolhido o caminho que estou trilhando agora;

À FAPESP pela concessão da Bolsa de Doutorado regular no país (Processo n.º 2011/08093-2) e pela Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior – BEPE (Processo n.º 2013/14120-8);

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos no início de meu Doutorado (Cota Institucional – Demanda Social);

Ao CNPq pelo Auxílio Financeiro (Processo n.º 475274/2011-3);

À minha querida orientadora Prof.^a Dr.^a Mariza Pires de Melo, por acreditar em minha força de vontade, pela paciência sempre, dedicação e sobretudo confiança e amizade. Gostaria de agradecer muito pelo grande apoio à oportunidade de intercâmbio e dizer que sou eternamente grata e orgulhosa por ter sido uma de suas orientadas. Sem você Prof.^a, sua disposição e seus valiosos ensinamentos, que muito me fizeram amadurecer, a realização deste trabalho não seria possível;

Ao Prof.^o Dr.^o Marco Antonio Trindade, co-orientador, por toda a atenção dispensada, pela grande paciência sempre, valiosas contribuições, dedicação, amizade e pelo imenso incentivo à realização do estágio no exterior, que contribuiu muito para o meu crescimento científico e intelectual;

Ao Prof.º Dr.º Fernando Gustavo Tonin pela colaboração nas análises de capacidade antioxidante e contribuições;

Ao Prof.º Dr.º César Gonçalves de Lima pelo auxílio nas análises estatísticas de parte do experimento;

À Prof.ª Dr.ª Carmen Josefina Contreras Castillo, por contribuir com suas valiosas sugestões;

À Dr.ª Ana Lúcia da Silva Corrêa Lemos, pela atenção dispensada, pelo apoio e constante incentivo para seguir sempre em frente;

À Prof.ª Dr.ª Maria Teresa de Alvarenga Freire, pela importante colaboração;

À Prof.ª Dr.ª Marta Mitsui Kushida, pela relevante contribuição;

Ao Dr.º José Manuel Lorenzo Rodríguez e ao Centro Tecnológico da Carne, pela oportunidade de realização do estágio no exterior;

À todos os Professores Doutores que me auxiliaram durante todo o período através da transmissão de seus valiosos conhecimentos e experiências de vida, bem como pela autorização do uso de seus laboratórios para a realização das análises;

Às melhores estagiárias do mundo Merícia Hirano e Juliana Tamura pela consideração, respeito e amizade, e pela grande dedicação durante o auxílio na execução de parte do experimento;

Aos colegas da pós-graduação com os quais convivi neste período em Pirassununga pelos momentos de alegrias e descontração;

Às amizades maravilhosas que conquistei durante o período de intercâmbio;

Aos especialistas dos laboratórios pelo auxílio nas análises;

Aos funcionários do Matadouro-escola da PCAPS da FZEA-USP, pelo apoio durante os processamentos;

Aos funcionários da biblioteca pela atenção e disposição;

À toda comunidade da FZEA/USP, professores, alunos e funcionários, que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho;

À todos os animais, pelos quais os estudos puderam ser realizados... minha eterna gratidão;

...Enfim, agradeço à Deus pela vida, por todos os desafios e grandes obstáculos que foram superados, pelos milagres concebidos, pelos méritos conquistados e por mais este avanço em minha carreira profissional!

E que eu continue com esta grande disposição, força de vontade e espírito para vencer SEMPRE...

*“Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo.”*
(Martin Luther King)

“Não podemos desistir se tudo parece estar tão difícil...”
(Adaptado por Heberty Paseto de Nega Karen)

RESUMO GERAL

FERNANDES, R.P.P. **Uso de extratos antioxidantes naturais obtidos de ervas aromáticas na elaboração de produtos a base de carne ovina**. 2015. 253p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Atualmente, existem inúmeros questionamentos quanto aos prováveis efeitos mutagênicos e carcinogênicos dos antioxidantes sintéticos no organismo, e devido a isto, hoje em dia estudos tendem a promover a substituição destes compostos por naturais com o intuito de maior segurança do alimento, sendo que estes apresentam benefícios potenciais à saúde. O objetivo deste estudo foi o uso de antioxidantes naturais obtidos de ervas e especiarias no desenvolvimento de produtos cárneos a base de carne ovina buscando suas propriedades antioxidantes e sensoriais, bem como agregar valor ao produto final, desenvolvido com carne de baixo valor comercial. O apelo de saudabilidade dos produtos foi obtido pela adição de extratos antioxidantes naturais à base de ervas aromáticas selecionadas em função de seu poder antioxidante e harmonização de sabores com a carne ovina. Um primeiro experimento (Capítulo 2) consistiu na avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de 13 espécies vegetais, sendo selecionados por *Cluster analysis* em relação a três métodos colorimétricos e sensorialmente após a adição em produto cárneo. O extrato selecionado foi avaliado quanto a acidez, à identificação e quantificação de compostos fenólicos e utilizado para a elaboração de hambúrguer congelado (Capítulo 3) e linguiça cozida (Capítulo 4), em diferentes concentrações, além de hambúrguer refrigerado sob atmosfera modificada (80% O₂ + 20% CO₂) (Capítulo 5), sendo comparados com tratamentos sem antioxidante (controle) e contendo antioxidante sintético (eritorbato de sódio ou BHT). Estes produtos cárneos foram avaliados durante armazenamento, respectivamente de 120, 135 e 20 dias, a partir de análises físico-químicas, sensoriais e microbiológicas, sendo inicialmente caracterizados quanto à composição centesimal. Orégano, manjerona, melissa e alecrim foram os extratos selecionados após agrupamento por similaridade quanto à capacidade antioxidante, sendo que os hambúrgueres elaborados com estes quatro extratos naturais não comprometeram a aceitação sensorial em relação ao eritorbato

de sódio ($P>0,05$). Resumidamente, os produtos cárneos elaborados mostraram resultados relevantes quanto à estabilidade oxidativa, apresentando os tratamentos contendo extrato natural, efeitos antioxidantes melhores e/ou compatíveis aos antioxidantes sintéticos. Hambúrguer congelado apresentou mais de 50% de redução ($P<0,001$) para nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), enquanto que linguiças cozidas apresentaram os menores valores para compostos voláteis ($P<0,001$) aos 135 dias de estocagem e a presença do extrato em hambúrgueres sob atmosfera modificada (ATM) manteve a qualidade sensorial por até 15 dias de armazenamento. Apesar de diferentes sistemas testados, o ensaio de redução férrica (FRAP) foi o método em comum mais eficaz para estimar a quantidade adequada de antioxidante natural a ser adicionada em comparação ao eritorbato de sódio. Em conclusão, extrato de orégano adicionado em produtos a base de carne ovina apresentou efeitos antioxidantes equivalentes aos antioxidantes sintéticos, não comprometendo a maioria dos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais, sendo considerado uma alternativa viável e favorecida pela grande vantagem da saudabilidade.

Palavras-chave: atmosfera modificada, especiarias, estabilidade, hambúrguer, linguiça, saudabilidade.

GENERAL ABSTRACT

FERNANDES, R.P.P. **Use of natural antioxidant extracts obtained from aromatic herbs in developing products based on sheep meat.** 2015. 253p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Currently, there are many questions concerning probable mutagenic and carcinogenic effects of synthetic antioxidants in the organism, and because of this, nowadays studies tend to promote the substitution of these by natural compounds with the aim of greater food safety and potential benefits for the health. The objective of this study was the use of natural antioxidants obtained from herbs and spices in the development of meat products ovine meat looking their antioxidant and sensory properties as well as add value to the final product, which was developed with low commercial value meat. The healthiness appeal of the product was obtained by adding natural antioxidants based extracts of aromatic herbs to be selected according to its antioxidant power and harmonization of flavors with the sheep meat. A first experiment (Chapter 2) was performed to evaluate the antioxidant capacity of 13 plant species extracts, being selected by Cluster analysis in relation to three colorimetric methods and sensory, after the addition in meat product. The selected extract was evaluated for acidity, identification and quantification of phenolic compounds and used for the preparation of frozen hamburger (Chapter 3) and cooked sausage (Chapter 4), at different concentrations, and refrigerated hamburger under modified atmosphere (80% O₂ + 20% CO₂) (Chapter 5), being compared to treatments without antioxidant (control) and containing synthetic antioxidant (sodium erythorbate or BHT). These meat products were evaluated during storage, respectively of 120, 135 and 20 days, from physical-chemical, sensory and microbiological analyzes, being initially characterized for chemical composition. Oregano, marjoram, lemon balm and rosemary were the extracts selected after grouping by similarity of the antioxidant capacity, and the hamburgers made with these four natural extracts did not affect the sensory acceptance in comparison to sodium erythorbate ($P>0.05$). Briefly, the meat products showed significant results in terms of oxidative stability, being the treatments containing natural extract presented

best effects antioxidant and/or compatible to synthetic compounds. Frozen burger presented more than 50% reduction ($P<0.001$) for tiobarbituric acid reactive substance TBARS, while cooked sausages had the lowest values for volatile compounds ($P<0.001$) at 135 days of storage, and the extract presence in burgers under modified atmosphere kept the quality sensory up to 15 days. Although different systems tested, ferric reducing antioxidant power (FRAP) was more effective common method to estimate the appropriate amount of natural antioxidant to be used in comparison to sodium erythorbate. In conclusion, oregano extract added products in the sheep meat presented equivalent antioxidant effects without to compromise the majority of physical-chemical, microbiological and sensory parameters, being thus considered a viable alternative, favored by the great advantage of healthiness.

Key-words: burger, healthiness, modified atmosphere, spices, stability, sausage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismo de ocorrência da oxidação lipídica.....	38
Figura 2 – Reações envolvidas no processo de oxidação protéica.....	40
Figura 3 – Mecanismo de ação de antioxidantes primários.....	41
Figura 4 – Estrutura química de alguns antioxidantes sintéticos.....	42
Figura 5 – Estrutura química dos flavonóides.	44
Figura 6 – Reação entre o DPPH* (à esquerda) e BHT.....	52
Figura 7 – Estabilização do radical livre DPPH* através de espécie reativa.....	52
Figura 8 – Fluxograma de processamento do hambúrguer.....	78
Figura 9 – Curvas obtidas para ensaio de DPPH* com diferentes volumes de extrato de orégano ao longo tempo de reação.....	84
Figura 10 – Cinética de estabilização para o ensaio DPPH* com diferentes extratos de ervas em mesmos volumes (170 µL)	84
Figura 11 – Variação da absorbância em função do tempo obtida a partir dos resultados apresentados na Figura 9	85
Figura 12 – Correlação linear entre conteúdo de fenólicos totais e capacidade antioxidante mensurada por métodos DPPH* (A) e FRAP (B)	88
Figura 13 – <i>Cluster analysis</i> dos 13 extratos com destaque para o grupo 1.....	89
Figura 14 – Ficha utilizada para avaliação das amostras de hambúrguer de cordeiro	119
Figura 15 – Valores de a* de hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C	124
Figura 16 – Estimativa indireta de formação de metamioglobina superficial em hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C	126
Figura 17 – Índice de TBARS de hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C	127
Figura 18 – Índice de peróxidos de hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C	129
Figura 19 – Formação de carbonilas de hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C	132
Figura 20 – Análise de tióis de hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C	133

Figura 21 – Poder redutor realizado em amostras de hambúrguer de cordeiro aos 0 e 120 dias.....	136
Figura 22 – Desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos aeróbios em hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C	138
Figura 23 – Avaliação sensorial de hambúrgueres de cordeiro após 120 dias de armazenamento a -18°C	140
Figura 24 – Fluxograma de processamento da linguiça cozida de ovelha.	156
Figura 25 – Apresentação das amostras para o teste de diferença do controle e visual utilizando escala de categoria verbal.	168
Figura 26 – Avaliação visual das amostras fatiadas de linguiça cozida.	169
Figura 27 – Parâmetros de cor objetiva de linguiça cozida durante armazenamento	172
Figura 28 – Oxidação lipídica para análise de TBARS de linguiça cozida durante armazenamento	176
Figura 29 – Índice de peróxidos de linguiça cozida durante armazenamento.....	177
Figura 30 – Formação de carbonilas em linguiça cozida durante armazenamento	179
Figura 31 – Evolução de ácidos graxos poliinsaturados livres em linguiça cozida durante o armazenamento.	187
Figura 32 – Alterações microbianas de hambúrgueres de ovelha durante armazenamento a 2°C.....	221
Figura 33 – Índice de TBARS em hambúrgueres de ovelha durante armazenamento a 2°C	228
Figura 34 – Alterações de carbonilas em hambúrgueres de ovelha durante armazenamento a 2°C.....	229
Figura 35 – Efeitos do antioxidante natural na percepção sensorial de hambúrgueres de ovelha durante armazenamento a 2°C	238

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conteúdo de fenólicos totais em 13 extratos naturais	81
Tabela 2 – Capacidade antioxidante equivalente total de 13 extratos naturais.....	83
Tabela 3 – Resultados de equivalências e volumes de extratos naturais em relação ao eritorbato de sódio 500 ppm.....	90
Tabela 4 – Teste de aceitação de hambúrgueres de cordeiro elaborados com diferentes antioxidantes.	91
Tabela 5 – Capacidade antioxidante de extrato de orégano e eritorbato de sódio .	120
Tabela 6 – Resultados de equivalências e volumes de extrato de orégano em relação ao eritorbato de sódio 500 ppm	121
Tabela 7 – Parâmetros de cor de hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C	123
Tabela 8 – Valores de pH de hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C	134
Tabela 9 – Formulação das linguiças cozidas de ovelha.	154
Tabela 10 – Capacidade antioxidante de extrato de orégano e eritorbato de sódio	165
Tabela 11 – Resultados de equivalências e volumes de extrato de orégano em relação ao eritorbato de sódio 500 ppm.	166
Tabela 12 – Composição centesimal de linguiça cozida	168
Tabela 13 – Avaliação gustativa/olfativa de linguiça cozida através de teste de diferença do controle a partir de Dunnet (5%).....	169
Tabela 14 – Avaliação visual de linguiça cozida através de teste de diferença do controle a partir de Dunnet (5%).	169
Tabela 15 – Valores de pH entre tratamentos de linguiça cozida durante armazenamento	170
Tabela 16 – Evolução da intensidade e tonalidade entre tratamentos de linguiça cozida durante armazenamento	173
Tabela 17 – Perfil de textura de linguiça cozida durante armazenamento.	174
Tabela 18 – Alterações de ácidos graxos livres em linguiça cozida durante armazenamento	180
Tabela 19 – Compostos voláteis de linguiça cozida durante armazenamento	189
Tabela 20 – Capacidade antioxidante do extrato de orégano.	215

Tabela 21 – Identificação por tentativa dos compostos fenólicos em extrato de orégano.	218
Tabela 22 – pH e parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) de hambúrgueres de ovelha durante armazenamento a 2°C.	224
Tabela 23 – Diferença de cor total (ΔE_{0-20}) mensurada na superfície de hambúrgueres de ovelha entre os dias 0 e 20 de armazenamento a 2°C.....	226
Tabela 24 – Efeitos de extratos naturais em ácidos graxos livres em hambúrgueres de ovelha nos dias 0 e 20 a 2°C.....	231
Tabela 25 – Compostos voláteis em hambúrgueres de ovelha durante armazenamento a 2°C.....	234

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	6
GENERAL ABSTRACT	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
LISTA DE TABELAS	12
SUMÁRIO	14
INTRODUÇÃO GERAL	21
HIPÓTESE	24
OBJETIVO GERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
CAPÍTULO 1	27
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
1 PRODUÇÃO DE CARNE OVINA NO BRASIL E NO MUNDO	28
2 PRODUTOS CÁRNEOS E EMBUTIDOS: HISTÓRICO, DEFINIÇÕES E LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	29
2.1 Hambúrguer	30
2.2 Linguiça cozida	31
3 ADITIVOS E INGREDIENTES: IMPORTÂNCIA E PROPRIEDADES	31
3.1 Cloreto de sódio (NaCl).....	32
3.2 Água ou gelo.....	33
3.3 Nitritos e nitratos	33
3.4 Condimentos.....	34
4 RADICAIS LIVRES: CONCEITOS	35
5 LIPÍDEOS E PROCESSO DE OXIDAÇÃO	36
6 PROTEÍNAS E PROCESSO DE OXIDAÇÃO PROTÉICA	38
7 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS E NATURAIS: FUNÇÕES, CLASSIFICAÇÃO, PRINCÍPIOS/MECANISMOS DE AÇÃO E APLICAÇÕES EM ALIMENTOS	40
8 ANTIOXIDANTES NATURAIS E APLICAÇÕES EM ALIMENTOS	44
9 ANÁLISES DE PODER ANTIOXIDANTE: FATORES INTERFERENTES	48
9.1 Folin-Ciocalteu	50
9.2 FRAP	51
9.3 DPPH*	51
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
CAPÍTULO 2	66
RESUMO.....	67

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE 13 EXTRATOS NATURAIS ATRAVÉS DE MÉTODOS DE FOLIN-CIOCALTEAU, DPPH[•] E FRAP E SELEÇÃO DOS EXTRATOS PROMISSORES A PARTIR DE CLUSTER ANALYSIS E ACEITAÇÃO SENSORIAL	67
1 INTRODUÇÃO	68
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	69
2.1 <i>Matérias primas</i>	69
2.2 <i>Preparo dos extratos naturais para realização das análises de capacidade antioxidante</i>	71
2.3 <i>Avaliação da capacidade antioxidante</i>	72
2.3.1 Folin-Ciocalteau	72
2.3.2 Capacidade antioxidante equivalente total (TEAC).....	73
2.4 <i>Cluster analysis</i>	75
2.5 <i>Preparo dos extratos naturais para elaboração de hambúrgueres de cordeiro</i>	75
2.6 <i>Cálculos de equivalência baseados em resultados de capacidade antioxidante</i>	76
2.7 <i>Elaboração de hambúrgueres de cordeiro</i>	77
2.8 <i>Análises sensoriais</i>	78
2.9 <i>Análises estatísticas e delineamento experimental</i>	79
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
3.1 <i>Avaliação da capacidade antioxidante</i>	80
3.1.1 Folin-Ciocalteau	80
3.1.2 Capacidade antioxidante equivalente total (TEAC).....	82
3.2 <i>Correlação entre o teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante</i>	87
3.3 <i>Cluster analysis</i>	89
3.4 <i>Cálculos dos volumes dos extratos naturais selecionados para a elaboração de hambúrgueres de cordeiro</i>	90
3.5 <i>Análises sensoriais</i>	91
4 CONCLUSÃO	92
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
CAPÍTULO 3	101
RESUMO.....	102
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DURANTE ARMAZENAMENTO DE HAMBÚRGUER DE CORDEIRO COM ADIÇÃO DE <i>ORIGANUM VULGARE</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	102
1 INTRODUÇÃO	104

2	MATERIAL E MÉTODOS.....	105
2.1	Matérias primas.....	105
2.2	Preparo de extrato natural de orégano para análises de capacidade antioxidante e posterior elaboração de hambúrgueres de cordeiro	105
2.3	Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de orégano e eritorbato de sódio por métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH [•] e FRAP.....	106
2.4	Cálculos de equivalência baseados em resultados de capacidade antioxidante.....	106
2.5	Determinação do pH do extrato de orégano	106
2.6	Análise de cromatografia gasosa por técnica de headspace para quantificação de resíduo de acetona no extrato de orégano.....	107
2.7	Elaboração de hambúrgueres de cordeiro	108
2.8	Análises físico-químicas.....	108
2.8.1	Composição centesimal	108
2.8.1.1	Umidade.....	109
2.8.1.2	Cinzas	109
2.8.1.3	Lipídeos	109
2.8.1.4	Proteínas.....	110
2.8.2	Cor objetiva e estimativa indireta de metamioglobina	110
2.8.3	pH	111
2.8.4	Perda de água por cocção (PAC) e redução de diâmetro (RD)	111
2.8.5	Análises de perfil de textura (TPA)	112
2.8.6	Oxidação lipídica.....	112
2.8.6.1	TBARS	112
2.8.6.2	Índice de peróxidos	113
2.8.7	Oxidação protéica	113
2.8.7.1	Carbonilas	113
2.8.7.2	Tióis livres	114
2.8.8	Avaliação da manutenção antioxidante do extrato de orégano no hambúrguer de cordeiro	115
2.8.9	Análises microbiológicas.....	115
2.8.9.1	Psicrotróficos aeróbios.....	116
2.8.9.2	Coliformes termotolerantes a 45°C	116
2.8.9.3	Estafilococos coagulase positiva.....	117

2.8.9.4 Clostrídios sulfito-redutores.....	117
2.8.9.5 Salmonella	118
2.8.10 Análises sensoriais	119
2.8.11 Análises estatísticas e delineamento experimental.....	119
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
3.1 <i>Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de orégano e eritorbato de sódio por métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP.....</i>	<i>120</i>
3.2 <i>Cálculos de equivalência baseados em resultados de capacidade antioxidante.....</i>	<i>121</i>
3.3 <i>Análise de cromatografia gasosa por técnica de headspace para quantificação de resíduo de acetona no extrato de orégano.....</i>	<i>121</i>
3.4 <i>Determinação do pH do extrato de orégano</i>	<i>122</i>
3.5 <i>Determinação da composição centesimal de hambúrgueres de cordeiro.</i>	<i>122</i>
3.6 <i>Estabilidade físico-química</i>	<i>122</i>
3.6.1 <i>Cor objetiva e estimativa indireta de metamioglobina.....</i>	<i>122</i>
3.6.2 <i>Oxidação lipídica.....</i>	<i>127</i>
3.6.3 <i>Oxidação protéica</i>	<i>131</i>
3.6.4 <i>pH</i>	<i>134</i>
3.6.5 <i>Perdas de água por cocção, redução de diâmetro e perfil de textura</i>	<i>135</i>
3.6.6 <i>Avaliação da manutenção antioxidante do extrato de orégano no hambúrguer de cordeiro</i>	<i>135</i>
3.7 <i>Estabilidade microbiológica.....</i>	<i>137</i>
3.8 <i>Estabilidade sensorial</i>	<i>139</i>
4 CONCLUSÃO	140
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
CAPÍTULO 4	149
RESUMO.....	150
USO DE EXTRATO ANTIOXIDANTE NATURAL OBTIDO DE ERVA AROMÁTICA NA ELABORAÇÃO DE EMBUTIDO COZIDO.....	150
1 INTRODUÇÃO	151
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	153
2.1 <i>Matérias primas.....</i>	<i>153</i>
2.2 <i>Preparo do extrato natural de orégano para análises de capacidade antioxidante e posterior elaboração de linguiças de ovelha</i>	<i>153</i>
2.3 <i>Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de orégano e eritorbato de sódio por métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP.....</i>	<i>153</i>

2.4	<i>Cálculos de equivalência baseados em resultados de capacidade antioxidante</i>	153
2.5	<i>Determinação do pH do extrato de orégano</i>	153
2.6	<i>Elaboração de linguiças cozidas de ovelha</i>	154
2.7	<i>Análises para caracterização das linguiças de ovelha</i>	156
2.7.1	Rendimento do processo de cozimento	157
2.7.2	Composição centesimal	157
2.7.3	Análises sensoriais	158
2.8	<i>Análises físico-químicas</i>	159
2.8.1	pH	159
2.8.2	Cor objetiva.....	159
2.8.3	Oxidação lipídica.....	160
2.8.4	Oxidação protéica	161
2.8.5	Análises de Perfil de Textura (TPA)	161
2.8.6	Perfil de ácidos graxos livres (AGL)	162
2.8.7	Perfil de compostos voláteis	163
2.9	<i>Análises Estatísticas e delineamento experimental</i>	164
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	165
3.1	<i>Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de orégano e eritorbato de sódio por métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP</i>	165
3.2	<i>Cálculos de equivalência baseados em resultados de capacidade antioxidante</i>	166
3.3	<i>pH do extrato de orégano</i>	167
3.4	<i>Caracterização das linguiças de ovelha</i>	167
3.4.1	Rendimento do processo de cozimento	167
3.4.2	Composição centesimal	167
3.4.3	Análises sensoriais	168
3.5	<i>Estabilidade físico-química</i>	170
3.5.1	pH	170
3.5.2	Parâmetros de cor objetiva	171
3.5.3	Análises de perfil de textura (TPA)	173
3.5.4	Oxidação lipídica.....	175
3.5.5	Oxidação protéica	178
3.5.6	Perfil de ácidos graxos livres (AGL)	180

3.5.7	Perfil de compostos voláteis	188
4	CONCLUSÃO	193
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	193
CAPÍTULO 5.....		205
RESUMO.....		206
EFEITOS DO EXTRATO DE ORÉGANO NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DE HAMBÚRGUERES DE OVELHA EMBALADOS EM ATMOSFERA MODIFICADA.....		206
1	INTRODUÇÃO	207
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	209
2.1	<i>Matérias primas.....</i>	<i>209</i>
2.2	<i>Preparo do extrato natural de orégano para análises de capacidade antioxidante e posterior elaboração de hambúrgueres de ovelha.....</i>	<i>209</i>
2.3	<i>Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de orégano por métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP.....</i>	<i>209</i>
2.4	<i>Perfil de compostos fenólicos do extrato de orégano por LC-DAD-ESI/MS</i>	<i>209</i>
2.5	<i>Elaboração de hambúrgueres de ovelha</i>	<i>210</i>
2.6	<i>Determinação da composição centesimal.....</i>	<i>211</i>
2.7	<i>Estabilidade dos hambúrgueres de ovelha durante armazenamento</i>	<i>211</i>
2.7.1	<i>Análises microbiológicas.....</i>	<i>212</i>
2.7.2	<i>pH</i>	<i>213</i>
2.7.3	<i>Parâmetros de cor instrumental.....</i>	<i>213</i>
2.7.4	<i>Oxidação lipídica - TBARS</i>	<i>213</i>
2.7.5	<i>Oxidação protéica</i>	<i>213</i>
2.7.6	<i>Perfil de ácidos graxos livres (AGL).....</i>	<i>213</i>
2.7.7	<i>Perfil de compostos voláteis</i>	<i>213</i>
2.7.8	<i>Análises sensoriais</i>	<i>213</i>
2.8	<i>Análises estatísticas e delineamento experimental.....</i>	<i>214</i>
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	214
3.1	<i>Conteúdo fenólico e atividade antioxidante do extrato de orégano.....</i>	<i>214</i>
3.2	<i>Identificação e quantificação de compostos fenólicos do extrato de orégano</i>	<i>215</i>
3.3	<i>Composição centesimal.....</i>	<i>220</i>
3.4	<i>Evolução microbiana durante armazenamento.....</i>	<i>221</i>
3.5	<i>Evolução do pH e parâmetros de cor durante o armazenamento.....</i>	<i>223</i>
3.6	<i>Evolução da oxidação lipídica durante o armazenamento.....</i>	<i>227</i>

3.7	<i>Evolução da oxidação de proteínas durante o armazenamento</i>	229
3.8	<i>Perfil dos ácidos graxos livres durante armazenamento.....</i>	230
3.9	<i>Perfil dos compostos voláteis durante armazenamento.....</i>	234
3.10	<i>Estabilidade sensorial.....</i>	236
4	CONCLUSÃO	239
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	240
	CONCLUSÃO GERAL.....	250
	ANEXO 1.....	251
	ANEXO 2.....	252
	ANEXO 3.....	253

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, a exigência por alimentos mais saudáveis e naturais está cada vez maior, representando uma grande tendência mundial (CASTELLINI, MUGNAI e BOSCO, 2002). Neste contexto, apesar de ainda apresentar um baixo consumo, a carne ovina está começando a se destacar quanto aos padrões dietéticos, despertando um grande interesse da população quanto às suas vantagens. Além da comercialização de cortes especiais, diferentes subprodutos cárneos podem ser elaborados a base de carne desta espécie (NOGUEIRA e JUNIOR, 2008). Porém, produtos processados são muito susceptíveis à rancidez oxidativa que promove alterações no sabor, odor, aroma, cor, textura e aparência e por este motivo, hoje em dia, estudos relacionados ao uso de antioxidantes para o controle da ocorrência da deterioração em alimentos e, conseqüentemente para a ampliação da vida de prateleira, estão cada vez mais comuns e sendo bastante pesquisados (HAYES et al., 2011a; RAMALHO e JORGE, 2006).

Em geral, os antioxidantes são compostos que apresentam a função de proteção do sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que são desencadeados principalmente pela ação de espécies reativas de oxigênio (KRINSKY, 1994). Becker, Nissen e Skibsted (2004), citam efeitos positivos do uso de antioxidantes em relação à qualidade dos alimentos, detectados através de métodos de determinação de oxidação lipídica e também protéica ou testes baseados na transferência de elétrons ou capacidade de doação de átomos de hidrogênio.

Os antioxidantes sintéticos são comumente utilizados pela indústria alimentícia com o objetivo de manter a qualidade dos alimentos. Entretanto, atualmente vários trabalhos comprovam que o uso destes antioxidantes pode promover efeitos deletérios ao organismo e devido à maior preocupação do consumidor com a segurança do alimento e sua saúde, a indústria alimentícia tenta reduzir a quantidade destes compostos sintéticos nos alimentos. Desta forma, muitos estudos são realizados na tentativa de substituir os aditivos sintéticos por alternativas naturais para que, além de aumentar o *shelf life* de alimentos, reduza a incidência de inúmeras doenças (ANGELO e JORGE, 2008; BREWER, 2011; HAYES et al., 2011b).

Já que os vegetais apresentam princípios ativos importantes (BALUNAS et al., 2006; VARANDA, 2006), várias pesquisas envolvendo compostos antioxidantes obtidos de extratos vegetais têm sido desenvolvidas por apresentarem grande importância na prevenção do desencadeamento das reações oxidativas, como por exemplo em alimentos ricos em óleos e gorduras (ANDREO e JORGE, 2006; SHAHIDI, ALASALVAR e LIYANA-PATHIRANÇAS, 2007), principalmente devido ao nível de compostos fenólicos (ANGELO e JORGE, 2007).

Mais de oito mil compostos fenólicos oriundos de fontes naturais são conhecidos (APAK et al., 2007), sendo que os antioxidantes naturais podem impedir a formação e eliminar radicais livres e consequentemente retardar ou prevenir danos oxidativos e a produção de sabor e odor indesejáveis nos substratos (BREWER, 2011; SHAHIDI, ALASALVAR, LIYANA-PATHIRANÇAS, 2007), principalmente devido às suas propriedades redutoras e estrutura química (HASLAM, 1996; SOARES, 2002).

Muitos alimentos são constituídos por ácidos graxos insaturados que estabelecem uma alta sensibilidade à deterioração em decorrência do processo oxidativo (BREWER, 2011). Este é um problema muito comum em produtos cárneos, por exemplo, sendo a ocorrência da reação de oxidação possivelmente controlada com a adição de compostos antioxidantes em combinação com condições adequadas de armazenamento destes produtos (BOEKEL et al., 2010). Como hoje em dia, há uma grande demanda por produtos de conveniência, ou seja, de rápido e fácil preparo, e, além disto, uma grande tendência pelo uso de ingredientes naturais, a elaboração de produtos utilizando vegetais ou seus extratos será beneficiada pela conferência de sabor e manutenção da qualidade, devido à presença de compostos antioxidantes (BREWER, 2011).

Recentemente, o consumo de produtos funcionais tem sido bastante incentivado e com isto, constituintes funcionais são bastante estudados, já que a preferência por uma menor quantidade de compostos sintéticos nos alimentos em geral é uma realidade. A adição de plantas e extratos vegetais que apresentam propriedades antioxidantes, por exemplo, em produtos processados, é uma ótima oportunidade de promover a ingestão de ingredientes funcionais sem causar mudanças drásticas nos hábitos alimentares da população (HAYES et al., 2011a; KARABAGIAS, BADEKA e KONTOMINAS, 2011). Além disto, inúmeros estudos citam resultados satisfatórios em relação à redução da deterioração em função do

uso de extratos naturais (CIRIANO et al., 2010; NIETO et al., 2010; SHIRAHIGUE, 2010; TRINDADE, MANCINI-FILHO e VILLAVIVENCIO, 2009) o que possibilita a substituição dos compostos sintéticos.

Desta maneira, o uso de antioxidantes de fontes vegetais está cada vez mais relevante principalmente por apresentarem uma boa aceitabilidade, baixo custo, grande disponibilidade e, sobretudo por demonstrarem uma alta capacidade de captar radicais livres, que promovem alterações nos ácidos nucléicos, proteínas, lipídeos e células. De acordo com estas funções, além de auxiliar na conservação da qualidade de alimentos, prevenindo impactos na textura, *flavor*, valor nutricional e no tempo de vida útil, conforme já relatado anteriormente, os antioxidantes naturais apresentam propriedades que podem reduzir a incidência de doenças crônicas e degenerativas, como por exemplo, enfermidades cardiovasculares e circulatórias, câncer, aterosclerose, artrite e inflamações (BALUNAS et al., 2006; DONG et al., 2010; HERTOOG et al., 1997; KATSUBE et al., 2003; NESS e POWLES, 1997; RENAUD et al., 1998; STOCLET et al., 2004; VARANDA, 2006; WANG e MAZZA, 2002).

Diante às informações acima descritas, este estudo se justifica pela alta demanda do consumidor atual por produtos com apelos de praticidade e principalmente saudabilidade, além do aproveitamento de cortes menos nobres. Desta maneira, já que os produtos cárneos apresentam limitações no tempo de vida útil devido ao alto teor de lipídeos em sua composição, e os extratos vegetais são fontes de compostos antioxidantes, estes podem representar uma solução viável para a substituição dos antioxidantes sintéticos comumente utilizados na indústria da carne. Além disto, os produtos cárneos elaborados com soluções alternativas podem contribuir para a ingestão de um alimento mais saudável, trazendo benefícios potenciais à saúde e se tornando uma fonte mais natural para a dieta humana, além de aumentar a rentabilidade do setor da ovinocultura pelo melhor aproveitamento de cortes menos nobres.

Vale ressaltar que, além desta procura por produtos de conveniência, o consumidor está cada vez mais preocupado com a saúde e buscando consumir alimentos mais saudáveis. Os produtos cárneos em geral são considerados como vilões, por apresentarem teores elevados de lipídeos, sódio e perfil de ácidos graxos (AG) mais saturado quando comparado ao perfil de AG dos alimentos de origem vegetal. Desta forma, o desenvolvimento de produtos cárneos com apelos de

saudabilidade é hoje uma tendência, sendo possível se observar diversas pesquisas sendo realizadas no sentido de reduzir o teor de sódio e lipídeos e mesmo acrescentar outros ingredientes, buscando melhorar o perfil nutricional dos produtos. Dentre as estratégias para aumentar a saudabilidade de produtos cárneos, o uso de antioxidantes naturais vem ganhando destaque, ainda que a maioria destas pesquisas seja realizada com carnes bovina, suína e de aves, sendo que existem poucos estudos visando a obtenção de produtos mais saudáveis à base de carne ovina.

HIPÓTESE

A adição de extrato de ervas aromáticas pode substituir os antioxidantes sintéticos na elaboração de produtos à base de carne ovina.

OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar a estabilidade de produtos a base de carne ovina com baixo valor comercial, em diferentes condições de armazenamento e embalagem, garantindo parâmetros de qualidade a partir da adição de extrato antioxidante natural.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a capacidade antioxidante por métodos colorimétricos de Folin-Ciocalteu, DPPH^{*} e FRAP de 13 extratos naturais obtidos de açafrão (*Curcuma longa* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), camomila (*Matricaria camomila*), erva doce (*Pimpinella anisum*), gengibre (*Zingiber officinalis*), hortelã (*Mentha piperita*), louro (*Laurus nobilis*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), manjerona (*Origanum*

majorana L.) , melissa (*Melissa officinalis*), mostarda (*Brassica hirta*), orégano (*Origanum vulgare*) e sálvia (*Salvia officinalis*). Será determinada, também, a atividade antioxidante do eritorbato de sódio, por ser um antioxidante empregado na elaboração de produtos cárneos.

- Selecionar os extratos mais promissores quanto à capacidade antioxidante, a partir de técnica multivariada por análise de agrupamentos (*Cluster Analysis*), e avaliar a aceitabilidade sensorial do produto cárneo elaborado com os antioxidantes naturais selecionados, em comparação ao sintético;
- Definir as quantidades de antioxidante natural a serem adicionadas nos produtos cárneos (mL/kg), no caso, hambúrguer congelado e linguiça cozida, com base nos resultados obtidos para a avaliação da capacidade antioxidante em relação ao eritorbato de sódio (500 ppm);
- Desenvolver um produto reestruturado cru (hambúrguer), utilizando carne de pescoço e retalhos de desossa de cordeiros e extrato antioxidante natural em 3 diferentes concentrações, sendo estes comparados aos produzidos sem antioxidante (controle) e com antioxidante sintético (eritorbato de sódio);
- Desenvolver um produto embutido e cozido (linguiça), utilizando carne proveniente de ovelhas de descarte e extrato antioxidante natural em 3 diferentes concentrações, sendo estes comparados aos produzidos sem antioxidante (controle) e com antioxidante sintético (eritorbato de sódio);
- Desenvolver um produto reestruturado cru (hambúrguer), armazenado em refrigeração sob atmosfera modificada (80% O₂ + 20% CO₂), utilizando carne proveniente de ovelhas de descarte e extrato antioxidante natural, sendo estes comparados aos produzidos sem antioxidante (controle) e com antioxidante sintético (BHT);
- Determinar a composição química das diferentes classes de produtos cárneos desenvolvidos e avaliar a estabilidade destes, a partir de análises físico-químicas, sensoriais e microbiológicas, quando armazenados em condições normais de comercialização;
- Verificar a manutenção da capacidade antioxidante do extrato natural nos diferentes produtos cárneos, visando inferir sobre a manutenção da funcionalidade do antioxidante adicionado, tanto do ponto de vista do poder de

conservação, quanto da ingestão do antioxidante como um possível adjuvante na manutenção da saúde humana.

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Produção de carne ovina no Brasil e no mundo

Mundialmente, a carne ovina representa uma pequena porcentagem, cerca de 7%, do total de carne produzida internacionalmente, sendo os maiores exportadores a Nova Zelândia e Austrália. Neste contexto, o Brasil ainda é considerado um país importador apesar de possuir grande potencial para ampliar a produção interna e para ser um grande produtor e exportador por apresentar um clima favorável e pasto com grande capacidade de produção (BONAGURIO, 2001; SAÑUDO et al., 2007; SOBRINHO et al., 2005).

O rebanho ovino brasileiro se encontra mais concentrado nas regiões Nordeste (49%) e Sul (40%), enquanto que as regiões Centro-Oeste (4,9%) e Sudeste (2,8%) estão representadas por baixa porcentagem da produção (NOGUEIRA e JUNIOR, 2008).

O consumidor final está cada vez mais exigente em relação à qualidade nutricional e sensorial da carne ovina, e devido a isto o produtor deve ter uma produção maximizada e padronizada para atender esta demanda e incentivar cada vez mais o consumo de carne desta espécie. Em geral, o consumo é influenciado diretamente pelas condições sócio-econômicas, crenças religiosas e região geográfica. Em relação ao Brasil, o hábito alimentar da população e o preconceito ainda existente em relação à qualidade de carne ovina, limitam o consumo per capita anual que infelizmente se mantém em torno de 0,7 Kg (BONAGURIO, 2001; EKIZ et al., 2012; MORENO, LOUREIRO e SOUZA, 2008; SEABRA et al., 2002).

Atualmente observa-se a expansão da ovinocultura principalmente devido à grande facilidade de adaptação dos animais às diferentes condições climáticas, além de maior demanda para o consumo da carne ovina, provavelmente incentivada pela maior exigência dos consumidores modernos. Esta carne é considerada uma alternativa em relação às outras espécies, com inúmeras estimativas de aumento quanto à produção mundial, que foi de aproximadamente 2,1% até 2014 (VACCA et al., 2008; VIANA, 2008).

2 Produtos cárneos e embutidos: Histórico, definições e legislação brasileira

Os produtos cárneos já eram elaborados desde a antiguidade, aproximadamente a 1500 anos a.C., pois nesta época o homem teve que se adaptar às condições em que vivia e procurar maneiras de conservar a carne para ampliar seu tempo de vida útil e ter alimento disponível por mais tempo. Desta forma, o processamento de carnes surgiu como uma ferramenta para preservação a partir do uso de inúmeros processos, como por exemplo, defumação, salga, dessecação, fermentação, condimentação e cozimento. Através destas práticas, uma grande quantidade de produtos cárneos começou a ser elaborada (GONÇALVES, 2002; ORDÓÑEZ et al., 2005a).

Durante o período da Idade Média os processos de conservação, sobretudo refrigeração e congelamento, ainda não tinham sido desenvolvidos e devido à isto, os produtos cárneos em geral, eram elaborados de acordo com a região e condição climática do local. Em regiões com clima frio, foram desenvolvidos produtos frescos crus e defumados e em regiões mais quentes, os desidratados. Nesta época, a elaboração dos produtos cárneos era considerada na maior parte das vezes uma arte, porém devido à urbanização e grande desenvolvimento industrial e econômico, a ciência passou a ter maior relevância para o entendimento dos princípios de elaboração destes produtos. Com isto, houve um maior desenvolvimento e aperfeiçoamento dos processos tecnológicos, com grandes descobertas, como por exemplo, tratamento térmico e criação de compressores de refrigeração, sendo que a indústria alimentícia passou por um período de grande evolução e começou a processar alimentos em grande escala para atender a população (GONÇALVES, 2002; OLIVO e SHIMOKOMAKI, 2006; ORDÓÑEZ et al., 2005a).

Os produtos cárneos são elaborados com carnes frescas, gorduras e subprodutos comestíveis, oriundos de uma ou mais espécies de animais abatidos sob condições humanitárias. Podem ser submetidos a um ou mais processos tecnológicos, e são adicionados de aditivos e ingredientes de acordo com limites estabelecidos pela legislação, sendo que não sofrem alterações na qualidade nutricional (BENEVIDES e NASSU, 2005; ORDÓÑEZ et al., 2005a).

O processamento industrial visa a agregação do valor de cortes que não são comercializados *in natura*, e o desenvolvimento de uma gama imensa de produtos

diferenciados classificados de acordo com o teor de umidade, grau de cominuição e temperatura de processamento. O maior objetivo da industrialização é a ampliação do tempo de vida útil e o máximo aproveitamento das estruturas das carcaças, sendo que isto certamente aumenta as alternativas industriais e garante a disponibilização de uma variedade de alimentos ao consumidor final (BENEVIDES e NASSU, 2005; GONÇALVES, 2002; TERRA, TERRA e TERRA, 2004).

A carne apresenta um alto valor nutricional, grande quantidade de água disponível e pH favorável e devido a estes fatores é muito susceptível ao desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Entretanto, para a elaboração de produtos cárneos com qualidade, segurança e maior tempo de vida útil, a origem da matéria prima é muito importante e sempre deve ser averiguada quanto à qualidade microbiológica inicial. Além disto, as boas práticas de fabricação e o uso de aditivos e ingredientes são primordiais (GARCÍA-ESTEBAN, ANSORENA e ASTIASARÁN, 2004; TERRA, TERRA e TERRA, 2004).

Neste trabalho foram elaborados dois tipos de produtos cárneos: hambúrguer e linguiça cozida.

2.1 Hambúrguer

De acordo com a Instrução Normativa nº 20, de 31 de Julho de 2000 (BRASIL, 2000a), hambúrguer é um produto cárneo industrializado obtido da carne moída dos animais de açougue, adicionado ou não de tecido adiposo e ingredientes, moldado e submetido a processo tecnológico adequado. Pode ser classificado em produto cru, semi-frito, cozido, frito, congelado ou resfriado. O produto elaborado deve apresentar a nomenclatura hambúrguer, seguido da espécie animal, por exemplo, no caso deste estudo, “hambúrguer de carne de cordeiro”.

A matéria prima triturada é submetida a processo de mistura com adição de aditivos e ingredientes, sendo a massa cárnea obtida, comprimida e moldada. O produto final é embalado e posteriormente mantido em câmara de congelamento (CANHOS e DIAS, 1983).

2.2 Linguiça cozida

Segundo a Instrução Normativa nº 20, de 31 de Julho de 2000 (BRASIL, 2000b), linguiça é um produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionados ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial e submetido ao processo tecnológico adequado. De acordo com a tecnologia de fabricação pode ser classificado em um produto fresco; seco, curado e/ou maturado e cozido. Em relação às linguiças cozidas, estas são submetidas ao processo de estufagem ou similar para desidratação e/ou cozimento, sendo o processo de defumação opcional. O produto elaborado deve apresentar a nomenclatura linguiça, seguida de expressões que a caracteriza, por exemplo, no caso deste estudo, “linguiça cozida de ovelha”.

A matéria prima triturada é submetida ao processo de moagem e mistura com adição de aditivos e ingredientes, sendo a massa cárnea homogeneizada, submetida à embutimento em envoltórios naturais ou artificiais, torcimento, secagem e pesagem. O produto final é embalado normalmente a vácuo e de acordo com sua classificação a temperatura de armazenamento sofre variações (CANHOS e DIAS, 1983).

3 Aditivos e ingredientes: importância e propriedades

Aditivos e ingredientes são substâncias utilizadas no processamento de produtos cárneos, com o intuito de reduzir o tempo de processo, melhorar rendimento e estabilidade, alterar qualidade sensorial, padronizar e ampliar tempo de vida útil, além de tornar o produto conveniente, sendo representados por cerca de 300 a 400 tipos (CAHILL et al., 1977; COSTA, 2004; LEMOS, 2002).

3.1 Cloreto de sódio (NaCl)

Este ingrediente é muito importante para agregar o gosto salgado. Exerce também função conservante, já que inibe o crescimento microbiano responsável pela deterioração da carne através do aumento da pressão osmótica e redução da atividade de água (Aa) ou água disponível, desidratação microbiana e ação tóxica do íon cloreto. Geralmente é utilizado em porcentagens entre 1,6 a 2,2 (CANHOS e DIAS, 1983; LEMOS, 2002).

O sal aumenta a capacidade de retenção de água pelas proteínas cárneas, principalmente as miofibrilares, já que os íons cloreto possuem grande capacidade de ligação com moléculas de água. Isto faz com que a força iônica do meio aumente e as proteínas absorvam a água e se solubilizem, ampliando o rendimento e reduzindo as perdas após a cocção, contribuindo para a maciez do produto final. Porém, se a quantidade de sal ultrapassar o limite de 6%, ocorre a precipitação das proteínas e consequentemente a perda da capacidade de retenção da água (LEMOS, 2002; TERRA, TERRA e TERRA, 2004).

Apesar das vantagens, o principal efeito negativo em relação às propriedades do NaCl é que ele pode atuar como um pró-oxidante e consequentemente diminuir a vida útil dos produtos cárneos em geral (LEMOS, 2002). Durante o processamento, pode ocorrer a redução e/ou inibição da atividade das enzimas antioxidantes do sistema, facilitando e/ou acelerando a ocorrência da oxidação lipídica ou a formação de espécies reativas (BREWER, 2011; CHAIYASIT et al., 2007).

Neste caso, o cloreto de sódio apresenta efeito de acordo com sua concentração, devido à capacidade de interromper a integridade da membrana celular, permitindo a alteração da reatividade de íons férricos/ferrosos livres e liberação destes aos substratos lipídicos resultando em aumento da peroxidação lipídica e consequentemente aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e conteúdo de peróxidos (MIN, CORDRAY e AHN, 2010; TAN e SHELEF, 2002).

3.2 Água ou gelo

A umidade representa cerca de 45 a 55% do peso total dos produtos cárneos, sendo que o teor de umidade varia de acordo com a quantidade de água acrescentada durante a elaboração e a proporção de carne magra e gordura, sendo normalmente adicionado 20 a 30% em relação à quantidade de carne utilizada para o preparo (LEMOS, 2002).

Durante o processo de mistura, a água ou gelo exercem a função de resfriamento da carne e evita o aquecimento mecânico. Além disto, auxilia na solubilização das proteínas hidrossolúveis, contribuindo para o aumento da capacidade de emulsificação e distribuição na massa, e na dissolução dos aditivos e ingredientes. As proteínas miofibrilares se tornam solúveis em presença de água e sal, que permite alcançar a força iônica adequada para a ocorrência da solubilização, sendo que durante a cominuição, há a formação de um gel que vai auxiliar na capacidade de ligação da água e emulsificação da gordura. As proteínas sarcoplasmáticas são solubilizadas em água e são mantidas desta maneira após acrescentar o sal (LEMOS, 2002; TERRA, TERRA e TERRA, 2004).

A quantidade de água é importante para definir a capacidade de liga das proteínas ou de emulsificação e varia de acordo com a qualidade e quantidade de proteína usada na formulação para que ocorra a retenção adequada ao produto, sendo que isto pode influenciar diretamente nas características sensoriais (LEMOS, 2002).

3.3 Nitritos e nitratos

Nitritos e nitratos de sódio ou potássio apresentam funções antioxidantes e antimicrobianas em meio ácido e contribuem para o desenvolvimento da coloração rósea e sabor característico de produto curado, impedindo o sabor de requeijado “*warmed over flavor*”, através de reações químicas em altas temperaturas envolvendo a mioglobina (CANHOS e DIAS, 1983; LEMOS, 2002; TERRA, 1998).

Os nitritos são importantes conservadores que agem eficazmente contra bactérias anaeróbias, inibindo principalmente a produção de toxinas do *Clostridium botulinum*. Apresentam estabilidade em soluções com temperatura menor que 5°C e pH maior do que 6, devendo a quantidade máxima permitida (200 mg/kg) ser diluída em água, sal e/ou dextrose para melhor homogeneização na massa cárnea. O uso de nitrito reduz o tempo de cura e é considerado mais reativo em meio ácido. Desta maneira, o teor mínimo de nitrito deve ser respeitado para impedir a “queima” do produto cárneo e a formação de nitrosaminas, em decorrência a combinação com aminas secundárias da própria carne, podendo ser adicionados agentes redutores para evitar este problema. Além destas funções, os nitritos também são considerados agentes quelantes de metais a partir da formação de compostos nitrosos com ação antioxidante, que em meio ácido liberam ácido nitroso que é convertido em óxido nítrico, com função de fixação de cor (CANHOS e DIAS, 1983; LEMOS, 2002).

Os nitratos atuam somente na cura prolongada da carne, após a conversão em nitrito pela ação de bactérias nitrato-redutoras dos gêneros *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Sarcina*, sendo que a velocidade de reação depende da quantidade de microrganismos presentes no alimento, pH, aumento da temperatura e teor de sal (CANHOS e DIAS, 1983; LEMOS, 2002).

3.4 Condimentos

A adição destes ingredientes tem a finalidade de melhorar ou alterar o sabor, permitindo a elaboração de produtos cárneos diversificados e diferenciados e, além disto, também podem apresentar características antioxidantes e conservantes. Incluem vegetais, sementes e folhas desidratadas. Por serem produtos naturais, os condimentos estão sujeitos à variação de sabor e até mesmo de suas propriedades. Devido a isto, a extração através de solventes é bem aceita no meio acadêmico e nas indústrias pela maior padronização, fácil armazenamento e transporte, e por não apresentarem contaminação microbiológica, já que passam por processo de esterilização (LEMOS, 2002; WERNER, 1983).

4 Radicais livres: conceitos

Os radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam número ímpar de elétrons na última camada eletrônica, ou seja, um ou mais elétrons desemparelhados. Desta forma são instáveis, muito reativos podendo se ligar a diferentes compostos para doar elétrons não pareados ou receber elétrons de outra molécula para formação de pares, participando de reações de oxidação e redução, respectivamente. Após a reação, os radicais atingem a estabilidade, porém a molécula atacada se transforma em um radical livre (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; KONG, ZHANG e XIONG, 2010; YOUNGSON, 1995).

Os radicais livres podem ocorrer em vários tipos de moléculas, mas as de maior interesse biológico são as originadas do oxigênio (O_2) e do óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) (ROVER JUNIOR, HÖEHR e VELLASCO, 2001). Neste contexto, espécies reativas podem ser formadas no meio biológico, apresentando características radicalares ou não. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) são espécies altamente reativas e não possuem características radicalares. Dentre as espécies reativas, as do oxigênio (ERO) são consideradas as mais relevantes, já que envolvem a maior parte dos danos celulares (CANTERLE, 2005).

Ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroperoxil ($HO_2^{\cdot}$), radical hidroxil ($OH^{\cdot}$), oriundo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e radical alcóxil ($RO^{\cdot}$), são alguns exemplos de espécies reativas derivadas do metabolismo do O_2 molecular (BOREK, 1997; MEIRELLES, 2009).

A partir do momento em que existe uma grande produção das espécies reativas e os sistemas antioxidantes não são suficientes para eliminar tais espécies, pode ocorrer o fenômeno do estress oxidativo, já que existe um desequilíbrio no sistema oxidativo celular, e com isto as macromoléculas biológicas, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, podem sofrer danos oxidativos, ocorrendo inúmeras alterações orgânicas e consequentemente o comprometimento da viabilidade celular (APAK et al., 2007; HAMAD et al., 2010; HASSIMOTTO, 2005; POVH, 2008). Este processo pode ocorrer nos sistemas biológicos vivos ou por exemplo em produtos de origem animal.

5 Lipídeos e processo de oxidação

Os lipídeos são substâncias que compõem estruturas celulares, pouco solúveis em água. Apresentam funções extremamente importantes principalmente em relação às propriedades sensoriais dos alimentos, com grande relevância em relação ao *flavor*, cor e textura, além de também serem considerados fonte energética, de ácidos graxos essenciais e de vitaminas lipossolúveis. Os lipídeos podem ser encontrados na forma de ésteres de ácidos graxos que são formados principalmente por tri, di e monoglicerídeos, sendo também encontrados como ácidos graxos livres, glicolipídeos, fosfolipídeos, esteróis e outros lipídeos complexos (ORDÓÑEZ et al., 2005b; SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999; SOARES, 2002).

A maioria dos lipídeos apresenta ácidos graxos, que são divididos em dois tipos: saturados e insaturados. Apesar de mais benéficas ao organismo, a presença dos ácidos graxos insaturados nos alimentos, promove uma redução do tempo de vida útil destes, já que apresentam uma maior susceptibilidade à oxidação devido às duplas ligações que caracterizam as insaturações (ANDREO e JORGE, 2006; COSTA et al., 2009). E, são exatamente as duplas ligações que são susceptíveis à reação com as espécies reativas dando início ao processo oxidativo.

A oxidação lipídica permite a ocorrência de modificações nutricionais, devido à perda de ácidos graxos essenciais, e, além disto, promove alterações organolépticas nos alimentos que reduzem sua aceitabilidade, já que ocorrem mudanças de sabor e odor com a ocorrência da rancidez. Além disto, a ocorrência do processo é determinada a partir da presença de inúmeros fatores, tais como, teor de ácidos graxos, concentração de íons metálicos e de oxigênio, podendo contribuir para a formação de compostos que apresentam algum grau de toxicidade (ABOU-ARAB e ABU-SALEM, 2010; AGUIRREZÁBAL et al., 2000; BRAND-WILLIAMS, CUVÉLIER e BERSET, 1995; COSTA et al., 2009; ORDÓÑEZ et al., 2005b).

Em carnes, é muito comum a ocorrência da oxidação em ácidos graxos insaturados de fosfolipídeos, antes dos triglicerídeos, sendo estes encontrados em todas as gorduras e óleos (BREWER, 2011; MERCIER et al., 2001; ORDÓÑEZ et al., 2005b).

A oxidação lipídica pode ocorrer através de reações hidrolíticas, com ação das enzimas lipases ou pelo calor e umidade; oxidação enzimática, através da ação

de enzimas lipoxigenases; fotoxidação, através de radiação UV e autoxidação, em presença de oxigênio (RAMALHO e JORGE, 2006).

De acordo com Ramalho e Jorge (2006), o principal processo oxidativo de óleos e gorduras consiste neste último mecanismo chamado de autoxidação. Segundo Ferreira e Matsubara (1997), pode ser chamado de lipoperoxidação ou de acordo com Ordóñez et al. (2005b) rancificação autoxidativa principalmente devido à característica autolítica. Segundo estes mesmos autores, este processo ocorre em três etapas principais que se desenvolvem de maneira simultânea, sendo considerada uma reação em cadeia: iniciação, propagação e término (Figura 1).

A primeira etapa, a iniciação, consiste na formação de radicais livres de carbono nos ácidos graxos insaturados (RH) após a remoção do hidrogênio ($H^{\bullet}$) por uma espécie reativa, como por exemplo, o $HO^{\bullet}$. O radical hidroxil é o mais reativo das ERO e é considerado um potente iniciador da oxidação lipídica (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Neste caso, as reações apresentam uma alta energia de ativação e, altas temperaturas e presença de luz são importantes para a sua ocorrência (ORDÓÑEZ et al., 2005b; RAMALHO e JORGE, 2006).

Na segunda etapa os radicais livres formados ($R^{\bullet}$) reagem com o oxigênio atmosférico (O_2), e são convertidos em produtos primários de oxidação, sendo estes o radical peroxil ($ROO^{\bullet}$), que abstraindo um átomo de $H^{\bullet}$ de um ácido graxo insaturado vizinho pode formar os hidroperóxidos ($ROOH$) e um outro radical livre ($R^{\bullet}$) é formado. Estes radicais livres formados são muito reativos e exercem a função de propagadores de reação, auxiliando na ocorrência da reação em cadeia e no processo autocatalítico mais intenso, já que podem reagir rapidamente com outras moléculas insaturadas (RH) e formar novos radicais livres ($R^{\bullet}$). Porém, devido à grande instabilidade, os hidroperóxidos ($ROOH$) sofrem decomposição, diminuindo seu conteúdo no final da reação, originando outros compostos, como por exemplo, hidrocarbonetos, ácido graxos de cadeia curta, radicais livres e compostos voláteis (carbonilas – aldeídos e cetonas; hexano e malonaldeído), que são importantes parâmetros para medidas do grau de oxidação lipídica em alimentos (ORDÓÑEZ et al., 2005b; RAMALHO e JORGE, 2006).

Quanto à terceira e última etapa, os radicais livres oriundos da decomposição dos produtos primários formados se associam e originam produtos secundários de oxidação, sendo estes produtos estáveis, ou seja, não reativos que favorecem a formação do odor de ranço. Quando há a associação de dois radicais livres, a

formação de destes cessa e esta etapa é finalizada, sendo necessário o início da reação de iniciação para que o processo oxidativo continue (ORDÓÑEZ et al., 2005b; RAMALHO e JORGE, 2006).

Figura 1 – Mecanismo de ocorrência da oxidação lipídica.

FONTE: Ramalho e Jorge (2006).

O grau de insaturação, a associação ou não dos ácidos graxos a outras moléculas, como por exemplo, triglicerídeos e fosfolipídeos, assim como condições de acondicionamento e armazenamento dos alimentos, levando-se em consideração a presença de pró-oxidantes, principalmente calor e luz, são fatores que influenciam diretamente na velocidade da reação química e favorecem a rancidez oxidativa (ANDREO e JORGE, 2006; CANHOS e DIAS, 1983). Além disto, os íons férricos/ferrosos, são importantes catalisadores da formação do radical hidroxil ($OH^{\bullet}$) a espécie determinante para a iniciação do processo (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

6 Proteínas e processo de oxidação protéica

As proteínas são constituintes muito importantes para a dieta humana, já que representam relevante fonte de aminoácidos essenciais, sendo os principais responsáveis pela textura em carnes (TRAORE et al., 2012).

Além dos lipídeos, as proteínas também são muito susceptíveis às reações de oxidação através de alterações químicas na cadeia de aminoácidos, que promove modificações nas propriedades funcionais das proteínas, reduzindo a qualidade dos alimentos (ESTÉVEZ, 2011; LUND, et al., 2008). Neste sentido, deteriorações funcionais, sensoriais e nutricionais, podem ser citadas como principais alterações de qualidade ocorridas em carnes e produtos cárneos (VENTANAS et al., 2006).

Estas modificações são resultantes de reações físico-químicas entre as proteínas, sendo influenciados pela presença de radicais livres, oriundos da formação de espécies reativas de oxigênio, ou a partir de produtos secundários da oxidação lipídica. Além disto, o tratamento térmico é um fator que desencadeia a oxidação, sendo responsável pela desnaturação protéica e aumento da hidrofobicidade superficial, além de alterações na composição dos ácidos graxos (SANTÉ-LHOUTELLIER et al., 2008; TRAORE et al., 2012; XIONG, PARK e OOIZUMI, 2009).

A oxidação das proteínas promove a formação de carbonilas, hidroperóxidos e sulfóxidos; fragmentação, a partir da quebra de ligações peptídicas e, ainda, agregação protéica, através da formação de ligações cruzadas entre cisteínas ou tirosinas e inativação de enzimas proteolíticas. Isto resulta na redução da solubilização de proteínas e consequentemente da suculência, porque a tenderização depende principalmente da hidrólise protéica pela ação de enzimas proteolíticas, dentre elas catepsinas e calpaínas (ESTÉVEZ et al., 2008; LUND et al., 2008; MORZEL et al., 2006).

Espécies reativas de oxigênio, tais como o ânion superóxido, radical hidroperoxil e radical hidroxil e também espécies não radicais, peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos (ROOH), podem estar envolvidos no processo de oxidação protéica. A formação destas espécies reativas depende da presença de ácidos graxos insaturados, pigmentos heme, metais de transição e enzimas oxidativas (ESTÉVEZ et al., 2011).

A carbonilação protéica é a modificação mais relevante como consequência da oxidação de proteínas (MERCIER et al., 2001), sendo que o mecanismo de ação e reações envolvidas podem ser observados na Figura 2. Inicialmente ocorre a abstração de um átomo de hidrogênio de uma molécula de proteína susceptível (PH) pela ação do radical hidroxil, formando um radical protéico (P[•]) e água. Em presença de O₂ este é convertido em um radical peroxil (POO[•]) que reage com outra molécula

susceptível à oxidação (PH), formando um peróxido alquila (POOH) e radical protéico (P[•]). O POOH pode reagir com espécies reativas de oxigênio, por exemplo, radical hidroperoxil (HO₂[•]), ou com formas reduzidas de metais de transição (Mⁿ⁺), formando radical alcóxil (PO[•]) e derivados de radical hidroxil (POH), que são substâncias estáveis (ESTÉVEZ et al., 2011).

PH = molécula de proteína susceptível; P[•] = radical protéico; POO[•] = radical peroxil; POOH = peróxido alquila; HO₂[•] = radical hidroperoxil; Mⁿ⁺ = metais de transição; PO[•] = radical alcóxil; POH = derivados de radical hidroxil.

Figura 2 – Reações envolvidas no processo de oxidação protéica.

FONTE: Adaptado de Estévez et al. (2011).

7 Antioxidantes sintéticos e naturais: funções, classificação, princípios/mecanismos de ação e aplicações em alimentos

Antioxidante é qualquer substância sintética ou natural que em baixas concentrações, em contato com substratos oxidáveis, como por exemplo, lipídeos, é capaz de impedir, inibir ou retardar sua deterioração principalmente por ação do O₂ atmosférico, controlando assim o processo oxidativo (APAK et al., 2007; BECKER, NISSEN e SKIBSTED, 2004; HUANG, OU e PRIOR, 2005).

Desta forma, o uso de compostos antioxidantes em alimentos tem como objetivo reduzir ou inibir a ocorrência dos processos oxidativos principalmente quando estes produtos são constituídos por uma grande quantidade de óleos e

gorduras (ABOU-ARAB e ABU-SALEM, 2010; ANDREO e JORGE, 2006), como por exemplo, os produtos cárneos. Neste caso, o tempo de vida útil será ampliado em consequência a uma melhor conservação (ORDÓÑEZ et al., 2005b).

Os antioxidantes exercem inúmeras funções, dentre elas o sequestro dos radicais livres, agentes redutores, quelação de íons metálicos, inibição de oxigênio singlete, diminuição da concentração de O_2 e cessação do processo oxidativo (APAK et al., 2007; BREWER, 2011). A eficiência de um sistema antioxidante depende da energia de ativação, do metabolismo de acordo com a estrutura química, do grau de absorção, potencial de óxido-redução, solubilidade e volatilidade (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006; BREWER, 2011).

Os antioxidantes podem ser classificados principalmente de acordo com o mecanismo de ação na cadeia de reação ou segundo sua origem (PIECADE, 2007).

Desta maneira, de acordo com a forma de atuação na cadeia oxidativa, podem ser divididos em primários ou promotores de quebra de cadeia, e secundários ou preventivos (ANGELO e JORGE, 2007; APAK et al., 2007). Os primários são compostos que exercem inúmeras funções, dentre elas inibição ou eliminação dos radicais livres formados durante as etapas de iniciação ou propagação, pela doação de elétrons ou átomos de hidrogênio formando compostos estáveis, com a estabilização das espécies reativas por ressonância e consequentemente interrompendo a cadeia de reação oxidativa, conforme Figura 3 (ANGELO e JORGE, 2007; BREWER, 2011; PEREIRA, 2009; WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005).

$LOO^{\bullet}$ = Radical livre; AH = Antioxidante; LOOH = composto estável; $A^{\bullet}$ = Radical inerte.

Figura 3 – Mecanismo de ação de antioxidantes primários.

FONTE: Adaptado de Huang, Ou e Prior (2005).

Já os secundários agem de diversas formas retardando a taxa de oxidação através da complexação de metais, principalmente ferro e cobre que catalisam oxidação; reposição de hidrogênio para antioxidantes primários; sequestro de oxigênio e desativação de oxigênio singlete, através de inúmeras enzimas dentre elas, glicose oxidase, superóxido dismutase e catalase; absorção de radiação UV e

decomposição de hidroperóxidos (ANGELO e JORGE, 2007; REISCHE, LILLARD e EITENMILLER, 2002; WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005).

Quanto à origem, os antioxidantes podem ser classificados em sintéticos e naturais, sendo os primeiros os mais amplamente utilizados na indústria alimentícia atualmente. Para a elaboração de produtos cárneos, normalmente são mais utilizados na indústria alimentícia o BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butil-hidroxi-tolueno), propil galato (PG), TBHQ (tercio-butil-hidroxiquinona) e eritorbato de sódio, sendo que as estruturas químicas de alguns podem ser visualizadas na Figura 4. No caso do eritorbato de sódio, que será utilizado no presente estudo, este pode ser adicionado aos produtos cárneos em níveis de 0,02 a 5% (AIURA, 2007; MERCADANTE et al., 2010).

BHA = butil-hidroxi-anisol; BHT = butil-hidroxi-tolueno; PG = propil galato; TBHQ = tercio-butil-hidroxiquinona.

Figura 4 – Estrutura química de alguns antioxidantes sintéticos.

FONTE: Ramalho e Jorge (2006).

Os antioxidantes naturais de origem vegetal são constituídos por compostos fitoquímicos, como por exemplo, compostos fenólicos e nitrogenados, carotenóides, ácido ascórbico e tocoferóis, de grande importância quanto à atividade antioxidante, já que estudos comprovam a redução da incidência de doenças com o consumo destes alimentos (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

Independente da natureza, todos os antioxidantes favorecem a interrupção do processo de oxidação, conforme já descrito anteriormente. Neste caso, os derivados fenólicos, por exemplo, no caso de compostos fenólicos, se transformam em radicais livres, porém estes não promovem nenhum tipo de reação oxidante, já que são estáveis devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM, 1996; RAMALHO e JORGE, 2006; SOARES, 2002).

Em geral, a maior parte dos antioxidantes exerce funções semelhantes: intensificam a absorção e neutralização de espécies reativas, inibem a ação de oxigênio singlete e decompõem peróxidos, já que eles apresentam propriedades de óxido-redução, que auxiliam na inibição da oxidação lipídica (AJAIKUMAR et al., 2005; DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004; MORTON et al., 2000).

Devido às diversas combinações, a ação dos compostos fenólicos resulta de substâncias chamadas polifenóis que são compostos aromáticos hidroxilados que comumente compõem os vegetais. Os compostos fenólicos apresentam pelo menos um anel aromático e um ou mais grupos hidroxilas, sendo dividido em 15 classes de acordo com sua estrutura, podendo estar dispostos na forma livre ou associados aos açúcares ou proteínas. Com isto, a eficiência dos antioxidantes depende da diversidade estrutural, ou seja, do grupo funcional presente, da posição no anel aromático e tamanho da cadeia (ANGELO e JORGE, 2007; APAK et al., 2007).

Dentre os fenólicos, os flavonóides, ácidos fenólicos, taninos e tocoferóis são os que mais se destacam e são considerados os antioxidantes mais comuns oriundos de fontes naturais (ANGELO e JORGE, 2007; KARAKAYA, 2004; PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006), correspondendo à mais da metade dos compostos fenólicos encontrados (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

Os flavonóides apresentam uma estrutura química composta por pelo menos dois anéis aromáticos (A e B) e um anel heterocíclico (C), estando unidos por três átomos de carbono e uma molécula de O_2 (Figura 5) (ANGELO e JORGE, 2007; APAK et al., 2007). De acordo com o grau de insaturação e oxidação, várias classes de flavonóides são definidas, como por exemplo, flavonóis, flavonas, flavononas, catequinas, antocianidinas e isoflavonas (APAK et al., 2007).

Figura 5 – Estrutura química dos flavonóides.

FONTE: Balasundram, Sundram e Samman (2006).

8 Antioxidantes naturais e aplicações em alimentos

Atualmente existe uma maior procura por alimentos saudáveis e devido às propriedades funcionais, os antioxidantes naturais são bastante estudados quanto ao seu potencial ativo. Muitos trabalhos citam a eficiência de compostos obtidos de plantas, vegetais e frutas tanto na inibição do processo de rancidez oxidativa quanto aos efeitos satisfatórios que podem promover ao organismo. Por outro lado, alguns autores afirmam que o uso de antioxidantes sintéticos pode estar associado ao maior risco de desencadeamento de doenças, e com isso estudos relacionados às fontes naturais são muito importantes para uma possível substituição dos antioxidantes sintéticos (AGUIRREZÁBAL et al., 2000; DHIBI et al., 2012; MELO e GUERRA, 2002; VIUDA-MARTOS et al., 2011; YILDIRIM, MAVI e KARA, 2001; ZHENG e WANG, 2001).

Desde antigamente, ervas e especiarias já eram utilizadas no preparo de alimentos, contribuindo com suas características organolépticas. Além de atribuir ou ressaltar sabor e aroma, estes ingredientes também possuem propriedades antioxidantes (MELO et al., 2003), que trazem inúmeros benefícios à saúde (MICHIELS et al., 2012).

Alimentos de origem vegetal são considerados as principais fontes de antioxidantes naturais, cuja atividade está associada diretamente à presença de compostos fenólicos. O teor destes depende da espécie, gênero, cultivar, condições de manejo, processamento e armazenamento (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006; RAMALHO e JORGE, 2006).

A aplicação e eficiência dos compostos naturais em sistemas alimentícios dependem da estrutura e reatividade química de seus constituintes e, além disto, da interação com componentes dos alimentos, devendo sempre ser avaliada a harmonização sensorial com o produto a ser elaborado (MARIUTTI e BRAGAGNOLO, 2009).

Os produtos alimentícios estão sujeitos às constantes alterações resultantes da ação de espécies reativas, porém o aumento do consumo de substâncias com potencial antioxidante provavelmente vai reduzir a ocorrência dos processos oxidativos e consequentemente diminuir a ocorrência de várias doenças (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

De acordo com a Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999 (BRASIL, 1999), extratos são produtos obtidos de esgotamento a frio ou a quente de produtos de origem animal ou vegetal utilizando solventes permitidos, podendo ou não ser eliminados posteriormente. Devem conter princípios sápidos aromáticos voláteis e fixos correspondentes ao respectivo produto natural. Podem se apresentar na forma de extratos líquidos ou secos, sendo os primeiros originados sem ou com parcial eliminação do solvente e os segundos originados após eliminação total do solvente. Estes podem ser classificados em concretos, resinóides ou purificados absolutos, sendo estes procedentes de extração de vegetais frescos, secos ou secos por dissolução em etanol, respectivamente.

Ultimamente, muitos estudos relacionados às fontes de antioxidantes naturais, sobretudo extratos e óleos essenciais de ervas e plantas aromáticas são comuns, principalmente devido aos resultados bastante satisfatórios destes compostos ao serem aplicados, por exemplo, nos alimentos. Neste caso, os estudos são de extrema importância, já que apresentam novas possibilidades para a indústria alimentícia em geral (CANADANOVIC-BRUNET et al., 2008).

Em estudo realizado por Pan et al. (2007), o extrato etanólico obtido de *Polygonum cuspidatum* ou *Japanese knotweed*, planta muito conhecida pela alta concentração de resveratrol, diminuiu significativamente a oxidação lipídica do óleo de amendoim, em comparação ao antioxidante sintético BHT. Extrato e óleo essencial de orégano em diferentes concentrações, foram utilizados por Boroski et al. (2012), para promover a estabilidade em bebidas lácteas enriquecidas de ômega-3, sendo que não afetaram a estabilidade física do produto e garantiram estabilidade oxidativa, apresentando o extrato uma maior eficiência em comparação ao óleo. Em

trabalho feito por Mollov et al. (2007), para fortificação de bebida à base de morango com copigmentos polifenólicos extraídos de pétalas de rosas, comprovou-se uma diminuição da degradação térmica de antocianinas, aumentando a estabilidade dos morangos submetidos ao processamento.

Com relação à adição de extratos naturais em carnes e produtos cárneos, os efeitos também são bastante promissores. Em um trabalho utilizando carne de cordeiro na elaboração de hambúrgueres com incorporação de fitoquímicos e extratos vegetais, Nieto et al. (2010) conseguiram resultados satisfatórios em relação à atividade antioxidante a partir da comparação dos tratamentos com um produto controle. A adição de resveratrol e citroflavan-3-ol em concentrações variando de zero a 400 mg/kg de carne, demonstraram-se bastante eficientes, pois reduziram a oxidação lipídica de hambúrgueres durante armazenamento em temperatura de 4°C por um período de 8 dias sob atmosfera modificada (75% O₂ + 25% CO₂).

Também utilizando antioxidantes naturais, Mercadante et al. (2010) avaliou o uso de zeaxantina e norbixina como substitutos de eritorbato de sódio em salsichas de carne suína e de frango, sendo que estes foram capazes de manter a estabilidade oxidativa dos embutidos. Shirahigue et al. (2010), utilizaram extratos de uva em 4 concentrações para avaliar a eficiência antioxidante em carne de frango processada e armazenada sob refrigeração por um período de 14 dias. Obtiveram como resultado final um aumento significativo da estabilidade oxidativa da carne processada, demonstrando consideráveis teores de compostos fenólicos, catequinas e epicatequinas, além da presença de flavonóides, que determinou uma elevada ação antioxidante. Segundo Sasse, Colindres e Brewer (2009), o uso de extrato de semente de uva como um antioxidante natural é tão eficaz quanto o sintético galato de propila muito utilizado atualmente em alimentos. Para a conservação de hambúrguer à base de carne suína, além do ingrediente natural inibir em grande porcentagem a ocorrência da rancidez oxidativa, também proporcionou a manutenção da cor do produto.

De acordo com Boskurt e Belibagli (2009), o uso de extrato de alecrim auxiliou no melhoramento da qualidade de produto à base de carne bovina cozida, sendo que realmente a quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico diminuiu em comparação à amostra controle, devido à ação antioxidante da especiaria incorporada. Hayes et al. (2009), utilizando vários antioxidantes naturais em sistemas modelos de músculos bovinos e suínos, dentre eles, luteína, sesamol e

extrato de folha de oliveira, observaram um grande potencial antioxidante destes para incorporação em produtos cárneos funcionais. Ciriano et al. (2010), para a elaboração de embutidos fermentados secos, utilizaram ingredientes que auxiliam na qualidade nutricional e, além disto, são saudáveis e responsáveis por inúmeros benefícios. Neste estudo, em relação às formulações tradicionais, o uso da *Melissa officinalis* permitiu a detecção de valores extremamente baixos em relação ao índice de oxidação lipídica e conseqüentemente menor quantidade de compostos voláteis, embora um alto teor de ácidos graxos poliinsaturados tenha sido encontrado. Trindade, Mancini-Filho e Villavivencio (2009), trabalharam com a adição de alecrim e extrato de orégano em carnes de hambúrguer bovino com o objetivo de avaliar a eficácia destes ingredientes quanto às alterações lipídicas comparativamente com antioxidantes sintéticos mais comumente utilizados em alimentos. De acordo com os resultados obtidos, concluíram que o extrato de alecrim foi o que apresentou uma maior capacidade antioxidante.

Mesmo com o atual crescimento do setor, é possível afirmar que o aproveitamento da carcaça de ovinos é ainda limitado, pois a comercialização de produtos oriundos de carne ovina é maior para os cortes tradicionais, como lombo (com ou sem osso), pernil e paleta, na maioria dos casos, sendo difícil a comercialização dos demais cortes a preços que garantam um bom retorno financeiro. Além do problema dos cortes cárneos com menor aceitação, também existe o problema do descarte de matrizes. Em rebanhos comerciais para a produção de cordeiros, as ovelhas são utilizadas normalmente até 6 ou 7 anos de idade. Estas, com idade avançada, são descartadas dos sistemas de produção e levadas ao abate, mas a carcaça não apresenta as características qualitativas ideais como a de animais jovens (cordeiros) (SILVA e PIRES, 2000; ZEOLA et al., 2005).

Desta forma, um melhor aproveitamento da carne de ovinos adultos de descarte, cujo sabor é mais pronunciado e a textura mais rígida, e dos cortes menos nobres, como pescoço e retalhos de desossa, na forma de embutidos poderia aumentar a rentabilidade do setor. Isto se explica, pois, atualmente, devido às mudanças dos hábitos alimentares da população, aceleradas intensamente pela urbanização e industrialização, o consumo de produtos processados se tornou crescente no Brasil. A modernidade influenciou os consumidores quanto a compra de alimentos de fácil preparo, sendo que a ampla procura por estes promoveu um aumento significativo no crescimento de produtos cárneos no Brasil, em sua maior

parte congelados, incluindo hambúrgueres (NASCIMENTO, OLIVEIRA e NASCIMENTO, 2005; TAVARES e SERAFINI, 2006).

9 Análises de poder antioxidante: fatores interferentes

Atualmente devido à grande tendência do uso de fontes naturais de antioxidantes, como uma alternativa ao uso dos sintéticos, existem muitos estudos relacionados com o isolamento de antioxidantes de suas matrizes. Dentre as metodologias citadas, o uso de solventes orgânicos e de fluido supercrítico ou sob atmosfera reduzida, são os mais comumente utilizados nos milhares de trabalhos realizados com este intuito (ANDREO e JORGE, 2006).

Além disto, o aumento dos estudos relacionados ao uso de antioxidantes em alimentos contribuiu para o desenvolvimento de muitos métodos para a determinação da capacidade antioxidante destes compostos (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006). Com isto, a atividade antioxidante de extratos vegetais pode ser determinada através de vários métodos laboratoriais, cujas respostas podem variar de acordo com o princípio do método e quanto à composição química das amostras (BREWER, 2011).

Em relação à quantificação dos compostos fenólicos, diversas análises podem ser realizadas, sendo as espectrofotométricas as mais comumente usadas para a determinação de um composto específico ou de uma classe de fenólicos (ANGELO e JORGE, 2007), em que a solução muda de cor após a redução do agente oxidante (APAK et al., 2007).

Vários fatores podem influenciar na extração e na solubilidade dos compostos antioxidantes, tais como, a natureza do composto a ser determinado, método de extração, tempo de armazenamento da amostra, tempo e temperatura da extração, polaridade do solvente, tamanho das partículas, grau de polimerização dos compostos e interação com outros constituintes da amostra, sendo que pode ocorrer até mesmo a destruição dos compostos antioxidantes se não existir uma adaptação e um controle de todos estes parâmetros (ANDREO e JORGE, 2006; ANGELO e JORGE, 2007; SHAHIDI e NACZK, 1995). Além disto, é importante citar que o

processo de extração requer o máximo cuidado, já que os compostos antioxidantes têm grande sensibilidade à luz, oxigênio e calor (PIEADDE, 2007).

Quanto ao teor de antioxidantes, também é importante citar que a composição química das espécies vegetais varia de acordo com fatores genéticos, a variedade da planta, grau de maturação, condições ambientais, principalmente temperatura e umidade relativa, local de cultivo, solo, estação do ano, momento de coleta, entre outros, que podem influenciar na reprodutividade dos métodos de análise (DE OLIVEIRA, 2009; OLIVEIRA, 2011).

O solvente é um dos fatores que pode influenciar diretamente no processo, devido à natureza química que faz com que ocorra a extração de quantidades diferenciadas dos compostos bioativos, de acordo com sua concentração existente, que também varia devido à possibilidade de interação destes com outros constituintes dos alimentos. Além disto, o solvente é extremamente importante porque ele influencia na capacidade de transferência do átomo de hidrogênio do substrato para o radical livre, por exemplo, radical hidroxil, até a formação de um composto estável e conseqüentemente, ocorrência da estabilização da espécie reativa (ANDREO e JORGE, 2006; BECKER, NISSEN e SKIBSTED, 2004).

Quanto ao tempo de extração, este deve variar entre 1 min e 24 h, porém, de acordo com o tipo de substrato, se períodos muito longos, pode ocorrer a oxidação dos fenólicos presentes. Em relação à temperatura, a extração pode ser subestimada pela ocorrência de decomposição, degradação química e enzimática e, além disto, pela volatilização dos compostos (ANDREO e JORGE, 2006).

No entanto, para a seleção dos antioxidantes, além da eficiência em baixas concentrações (0,001 a 0,1%), devem ser consideradas também as características dos extratos obtidos, dentre eles, a compatibilidade com o alimento em que serão aplicados; ausência de influência negativa na cor, odor e sabor no produto final; apresentar estabilidade durante o processamento e armazenamento; serem atóxicos; aprovados pela legislação, apresentarem um baixo custo e boa aceitação pelo consumidor (PIEADDE, 2007).

9.1 Folin-Ciocalteu

A quantificação espectrofotométrica utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu é uma das metodologias mais utilizadas para medir a capacidade redutora de amostras, que permite inferir o teor de compostos fenólicos totais (HUANG, OU e PRIOR, 2005). É um ensaio baseado na transferência de elétrons que mede a capacidade de redução de um oxidante que muda de cor de acordo com o teor de compostos com atividade redutora (BECKER, NISSEN e SKIBSTED, 2004).

O reagente de Folin-Ciocalteu é uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) e fosfotungstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$), em que o molibdênio (Mo_8O_{23}) e o tungstênio (W_8O_{23}) encontram-se no estado de oxidação VI, apresentando inicialmente coloração amarela. Em presença de compostos fenólicos, é formado o complexo molibdênio-tungstênio que apresenta coloração azul após reação, nos quais a média do estado de oxidação dos metais permanece entre V e VI, permitindo absorção em onda de 760 nm. Através da coloração formada, pode-se determinar a concentração dos compostos redutores (DE OLIVEIRA et al., 2009; GEORGÉ et al., 2005).

A reação ocorre em meio básico através da desprotonação dos compostos fenólicos, originando ânions fenolatos, ocorrendo reação de oxirredução entre estes e o reagente de Folin-Ciocalteu, sendo que o molibdênio sofrerá redução e sua coloração sofrerá alteração, conforme citado acima (DE OLIVEIRA et al., 2009).

De acordo com o reagente padrão, os resultados podem ser expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) (AKINMOLADUN, OBUOTOR e FAROMBI, 2010; CHENG et al., 2007), equivalente de catequina (AMAROWICZ et al., 2010; ARFAN et al., 2007), quercetina (IVANOVA et al., 2005), ácido tânico (DEVATKAL e NAVEENA, 2010; PÉREZ, CALDERÓN e CROCI, 2007), ácido clorogênico (CANADANOVIC-BRUNET et al., 2008), ácido caféico (CETOJEVIC-SIMIN et al., 2010), hidroxitirosol (DHIBI et al., 2012), tirosol (EL-ABBASSI et al., 2012), sendo que de acordo com todos estes estudos a mais comumente utilizada é a primeira forma de comparação. A partir dos resultados obtidos, pode-se inferir que quanto maior é o poder redutor da amostra, maior é o seu poder antioxidante.

9.2 FRAP

O ensaio FRAP (*Ferric ion Reducing Antioxidant Power*) determina a atividade antioxidante total de uma amostra através da capacidade de redução férrica. O reagente FRAP utilizado no ensaio é preparado através da mistura de tampão acetato de sódio contendo ,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) e solução de cloreto férrico. Neste caso, em meio ácido, há a formação do complexo férrico- tripiridiltriazina ($\text{Fe}^{+3}.\text{TPTZ}$) de coloração alaranjada que em presença de compostos redutores é reduzido para a forma ferrosa (Fe^{+2}), pela doação/transferência de elétrons, promovendo o desenvolvimento de uma coloração azul intensa. A redução do complexo é favorecida pela presença de antioxidantes redutores da amostra e o complexo exerce função de agente oxidante (BECKER, NISSEN e SKIBSTED, 2004; BENZIE e STRAIN, 1996; HUANG, OU e PRIOR, 2005).

As absorbâncias obtidas em comprimento de onda 593 nm, são lineares de acordo com as concentrações da amostra que contêm o antioxidante. Os resultados finais geralmente são expressos em μM ($\mu\text{mol/litro}$), por meio de curva de calibração a partir de vários compostos padrões, descritos pela literatura como, por exemplo, ácido ascórbico, bilirrubina, ácido úrico, albumina e alfa-tocoferol (BENZIE e STRAIN, 1996), além do trolox (MAQSOOD e BENJAKUL, 2010; THAIPONG et al., 2006), catequina e vitamina E (AGBOR et al., 2005).

9.3 DPPH

O ensaio DPPH $\cdot$ baseia-se na avaliação de atividade antiradicalar de substâncias antioxidantes. Inicialmente o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH $\cdot$) apresenta coloração púrpura e após reação química, é reduzido a 2,2-difenilpicril-hidrazina, resultando em descoloração da solução, passando a possuir coloração amarela. O radical pode ser reduzido por um antioxidante, com a doação de um átomo de H $\cdot$ (Figura 6), ou a partir da reação com um radical livre (R $\cdot$) (Figura 7), formando um composto estável (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995; DE OLIVEIRA et al., 2009; KRISHNAIAH, SARBATLY e NITHYANANDAM, 2011).

Figura 6 – Reação entre o $\text{DPPH}^\bullet$ (à esquerda) e BHT.

FONTE: Adaptado de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e de Oliveira et al. (2009).

Figura 7 – Estabilização do radical livre $\text{DPPH}^\bullet$ através de espécie reativa.

FONTE: Adaptado de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e Rufino et al. (2007).

A atividade antioxidante é avaliada através da cinética de competição na curva de decaimento, sendo que a diminuição dos valores em diferentes concentrações do ensaio indica a presença dos compostos antioxidantes (APAK et al., 2007; KRISHNAIAH, SARBATLY e NITHYANANDAM, 2011). A mensuração é realizada em espectrofotômetro com absorvância de 515 nm (KRISHNAIAH, SARBATLY e NITHYANANDAM, 2011), e os resultados geralmente são expressos através do valor EC_{50} que indica a concentração de amostra que promove o consumo de 50% da concentração do $\text{DPPH}^\bullet$ em solução. Ou seja, é determinada a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais, em relação à quantidade de $\text{DPPH}^\bullet$ que foi consumido durante a reação (DE OLIVEIRA et al., 2009; KOŞAR; DORMAN e HILTUNEN, 2005).

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-ARAB, E.A.; ABU-SALEM, F.M. Effect of natural antioxidants on the stability of ostrich meat during storage. **Grasas y Aceites**, v.61, n.1, p.102-108, 2010.

AGUIRREZÁBAL, M.M. et al. The effect of paprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. **Meat Science**, v.54, p.77-81, 2000.

AGBOR, G.A. et al. Antioxidant capacity of some herbs/spices from cameroon: a comparative study of two methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.17, p.6819-6824, 2005.

AIURA, F.S. **Ação do extrato de alecrim e fontes de óleo na qualidade de filés de tilápia do Nilo**. 2007. 99p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, 2007.

AJAIKUMAR, K.B. et al. The inhibition of gastric mucosal injury by Punicagranatum L. (pomegranate) methanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.96, n.1/2, p.171-76, 2005.

AKINMOLADUN, A.C.; OBUOTOR, E.M.; FAROMBI, E.O. Evaluation of antioxidant and free radical scavenging capacities of some nigerian indigenous medicinal plants. **Journal of Medicinal Food**, v.13, n.2, p.444-451, 2010.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **B.CEPPA**, v.24, n.2, p.319-336, 2006.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.232-240, 2007.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Avaliação do óleo de girassol adicionado de antioxidantes sob estocagem. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.2, p.498-502, 2008.

APAK, R. et al. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, v.12, p.1496-1547, 2007.

ARFAN, M. et al. Antioxidant activity of extracts of mallotus philippinensis fruit and bark. **Journal of Food Lipids**, v.14, p.280-297, 2007.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, p.191-203, 2006.

BALUNAS, M.J. et al. Relationships between inhibitory activity against a cancer cell line panel, profiles of plants collected, and compound classes isolated in an anticancer drug discovery project. **Chemistry and Biodiversity**, v.3, n.8, p.897-915, 2006.

BECKER, E.M.; NISSEN, L.R.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research Technology**, v.219, p.561-571, 2004.

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**, v.239, p.70-76, 1996.

BENEVIDES, S.D.; NASSU, R.T. **Produtos cárneos**. 2005. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/ovinos_de_corte/arvore/CONT000g3izo_hks02wx5ok0tf2hbweqanedo.html>. Acesso em: 07 Mar. 2015.

BOEKEL, M.V. et al. A review on the beneficial aspects of food processing. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.54, p.1215–1247, 2010.

BONAGURIO, S. **Qualidade da carne de cordeiros Santa Inês puros e mestiços com Texel abatidos com diferentes pesos**. 2001. 150p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, 2001.

BOREK, C. Antioxidants and cancer. **Science and Medicine**, v.4, n.6, p.52-62, 1997.

BOROSKI, M. et al. Use of oregano extract and oregano essential oil as antioxidants in functional dairy beverage formulations. **LWT - Food Science and Technology**, v.47, p.167-174, 2012.

BOSKURT, H.; BELIBAGLI, K.B. Use of rosemary and Hibiscus sabdariffa in production of kavurma, a cooked meat product. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, p.1168-1173, 2009.

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

BRASIL. Portaria SVS/MS n.º 104, de 14 de maio de 1999. Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/Aromas. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 17 maio 1999. Seção I.

BRASIL. Instrução Normativa n.º 20, de 31 de julho de 2000. Dispõe sobre os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de hambúrguer. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília-DF, jul. 2000a.

BRASIL. Instrução Normativa n.º 04, de 31 de Março de 2000. Dispõe sobre os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de linguiça. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília-DF, mar. 2000b.

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

CAHILL, V.R. et al. **Princípios do Processamento de Carne**. Centro de Pesquisa e Treinamento em Tecnologia de Carne. Campinas: ITAL/CTC/EMBRAPA, 1977. p. 54, 55, 60 e 61 (Manual Técnico).

CANADANOVIC-BRUNET, J. et al. Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts. **Journal of Medicinal Food**, v.11, n.1, p.133-143, 2008.

CANHOS, D.A.L.; DIAS, E.L. **Tecnologia de Carne Bovina e Produtos Derivados**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1983. 440p.
CANTERLE, L.F. **Erva-mate e atividade antioxidante**. 2005. 100p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, 2005.

CASTELLINI, C.; MUGNAI, C.; DAL BOSCO, A. Effect of organic production system on broiler carcass and meat quality. **Meat Science**, v.60, p.219-225, 2002.

CETOJEVIC-SIMIN, D.D. et al. Antioxidative and antiproliferative activities of different horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. **Journal of Medicinal Food**, v.13, n.2, p.452-459, 2010.

CHAIYASIT, W. et al. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.47, n.3, p.299-317, 2007.

CHENG, K.-W. et al. Inhibitory Effect of Fruit Extracts on the Formation of Heterocyclic Amines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.10359-10365, 2007.

CIRIANO, M.G.-I. et al. Selenium, iodine, α -3 PUFA and natural antioxidant from *Melissa officinalis* L.: A combination of components from healthier dry fermented sausages formulation. **Meat Science**, v.85, p.274-279, 2010.

COSTA, L.O. **Processamento e diminuição do reprocesso do hambúrguer bovino (HBV)**. 2004. 127p. Monografia (Trabalho de conclusão de curso) – Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2004.

COSTA, R.G. et al. Características Sensoriais da Carne Ovina: Sabor e Aroma. **Revista Científica de Produção Animal**, v.11, n.2, p.157-171, 2009.

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

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

DEVATKAL, S.K.; NAVEENA, B.M. Effect of salt, kinnow and pomegranate fruit by-product powders on color and oxidative stability of raw ground goat meat during refrigerated storage. **Meat Science**, v.85, p.306-311, 2010.

DHIBI, M. et al. Fatty acid profiles, antioxidant compounds and antiradical properties of *Pinus halepensis* Mill. cones and seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, p.1702-1708, 2012.

DONG, X.-P. et al. Preparation and in vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from oyster (*Crassostrea talienwhannensis*) meat. **International Journal of Food Science and Technology**, v.45, p.978-984, 2010.

EKIZ, B. et al. Effect of production system on carcass measurements and meat quality of Kivircik lambs. **Meat Science**, v.90, p.465-471, 2012.

EL-ABBASSI, A.; KIAI, H.; HAFIDI, A. Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. **Food Chemistry**, v.132, p.406-412, 2012.

ESTÉVEZ, M. et al. Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. **Meat Science**, v.80, p.1290-1296, 2008.

ESTÉVEZ, M. Protein carbonyls in meat systems: A review. **Meat Science**, v.89, p.259-279, 2011.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

GARCÍA-ESTEBAN, M.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Comparison of modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period storage of dry-cured ham: effects on colour, texture and microbiological quality. **Meat Science**, Barking, v.67, p.57-63, 2004.

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

GONÇALVES, J.R. Classificação dos Embutidos Cárneos. In: LEMOS, A.L.S.C.; YAMADA, E. A. **Princípios do Processamento de Embutidos Cárneos**. Campinas: CTC/ITAL, 2002. p.3-9.

HAMAD, I. et al. Antioxidant and cytotoxic activities of *Aphanes arvensis* extracts. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.65, p.44-49, 2010.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v.59, n.2, p.205-215, 1996.

HASSIMOTTO, N.M.A. **Atividade antioxidante de alimentos vegetais. Estrutura e estudo de biodisponibilidade de antocianinas de amora silvestre (*Morus sp.*)**. 2005. 176p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2005.

HAYES, J.E. et al. The effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on lipid oxidation and oxymyoglobin oxidation in bovine and porcine muscle model systems. **Meat Science**, v.83, p.201-208, 2009.

HAYES, J.E. et al. Evaluation of the effects of selected plant-derived nutraceuticals on the quality and shelf-life stability of raw and cooked pork sausages. **LWT - Food Science and Technology**, v.44, p.164-172, 2011a.

HAYES, J.E. et al. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. **Food Chemistry**, v.126, p.948-955, 2011b.

HERTOG, M.G. et al. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.65, N.5, p.1489-1494, 1997.

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

IVANOVA, D. et al. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.145-150, 2005.

KARABAGIAS, I.; BADEKA, A.; KONTOMINAS, M.G. Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. **Meat Science**, v.88, p.109-116, 2011.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.44, n.6, p.453-64, 2004.

KATSUBE, N. et al. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.68-75, 2003.

KOŞAR, M.; DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected lumiaceae species. **Food Chemistry**, v.91, p.525-533, 2005.

KONG, B.; ZHANG, H.; XIONG, Y.L. Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action. **Meat Science**, v.85, p.772-778, 2010.

KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v.66, p.1003-1010, 1994.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v.89, p.217-233, 2011.

LEMOS, A.L.S.C. Ingredientes e aditivos no processamento de embutidos. In: LEMOS, A.L.S.C.; YAMADA, E.A. **Princípios do Processamento de Embutidos Carneos**. Campinas: CTC/ITAL, 2002. p.11-26.

LUND, M.N. et al. Effects of dietary soybean oil on lipid and protein oxidation in pork patties during chill storage. **Meat Science**, v.79, p.727-733, 2008.

MAQSOOD, S.; BENJAKUL, S. Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. **Food Chemistry**, v.119, p.123-132, 2010.

MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.68, n.1, p.1-11, 2009.

MEIRELLES, R.L. **Efeitos da suplementação de antioxidantes naturais em tecidos bovinos da raça Brangus**. 2009. 77p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim SBCTA**. Campinas: v.36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MELO, E.A. et al. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, p.195-199, 2003.

MERCADANTE, A.Z. et al. Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. **Meat Science**, v.84, p.718-726, 2010.

MERCIER, Y. et al. Lipid and protein oxidation in microsomal fraction from turkeys: influence of dietary fat and vitamin E supplementation. **Meat Science**, v.58, p.125-134, 2001.

MICHIELS, J.A. et al. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. **Food Chemistry**, v.130, p.986-993, 2012.

MIN, B.; CORDRAY, J.C.; AHN, D.U. Effect of NaCl, Myoglobin, Fe(II), and Fe(III) on Lipid Oxidation of Raw and Cooked Chicken Breast and Beef Loin. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v.58, p.600-605, 2010.

MOLLOV, P. et al. Colour stability improvement of strawberry beverage by fortification with polyphenolic copigments naturally occurring in rose petals. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.8, p.318-321, 2007.

MORENO, G.M.B; LOUREIRO, C.M.B.; SOUZA, H.B.A. Características qualitativas da carne ovina. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n.381, p.76-90, 2008.

MORTON, L.W. et al. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Oxford, v.27, n.3, p.152-59, 2000.

MORZEL, M. et al. Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. **Meat Science**, v.73, p.536-543, 2006.

NASCIMENTO, M.G.F.; OLIVEIRA, C.Z.F; NASCIMENTO, E.R. Hambúrguer: Evolução comercial e padrões microbiológicos. **B. CEPPA**. Curitiba, v.23, n.1, p.63-65, 2005.

NESS, A.R.; POWLES, J.W. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. **International Journal of Epidemiology**, v.26, p.1-13, 1997.

NIETO, A.I.A. et al. Screening of phytochemicals in fresh lamb meat patties stored in modified atmosphere packs: influence on selected meat quality characteristics. **International Journal of Food Science and Technology**, v.45, p.289-294, 2010.

NOGUEIRA, E. A.; JUNIOR, S. N. **Ovinos e caprinos avançam em São Paulo**. Instituto de Economia Agrícola – APTA. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/OUT/verTexto.php?codTexto=4136>>. Acesso em: 05 Abr. 2015.

OLIVEIRA, C.A. **Avaliação da atividade antioxidante do extrato de ervacideira-de-arbusto (*Lippia alba* (mill) ne brown) em embutido cozido a base de carne ovina de descarte**. 2011. 120p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, 2011.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. São Paulo: Varela, 2006. Cap. 12, p.123-131.

ORDÓÑEZ, J.A.P. et al. **Tecnologia de Alimentos**: alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, 2005a. Cap.10, 294p. v.2.

ORDÓÑEZ, J.A.P. et al. **Tecnologia de alimentos**: alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, 2005b. Cap.3; 10, 279p. v.1.

PAN, Y. et al. Antioxidant potential of ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* and application in peanut oil. **Food Chemistry**, v.105, p.1518-1524, 2007.

PEREIRA, M.G. **Aplicação de antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de ave**. 2009. 128p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, 2009.

PÉREZ, M. B.; CALDERÓN, N. L.; CROCI, C. A. Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Food Chemistry**, v.104, n.2, p.585-592, 2007.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v.39, p.791-800, 2006.

PIEDADE, K.R. **Uso de ervas aromáticas na estabilidade oxidativa de filés de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) processados**. 2007. 160p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

POVH, J.A. **Reguladores Vegetais e Bioestimulantes no desenvolvimento de *Salvia officinalis* L.: avaliações fisiológicas, bioquímicas e fitoquímicas**. 2008. 115p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, 2008.

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

REISCHE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, R.R. Antioxidants. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p.489-516.

RENAUD, S.C. et al. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. **Epidemiology**, v.9, n.2, p.184-188, 1998.

ROVER JUNIOR, L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutadiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v.24, n.1, p.112-119, 2001.

RUFINO, M.S.M. et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela capturado radical livre DPPH*. Fortaleza: Embrapa agroindústria Tropical. 2007. 4p. (Comunicado Técnico 127).

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics**: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic Publishing, 1995. 331p.

SHIRAHIGUE, L.D. et al. Wine industry residue as antioxidant in cooked chicken meat. **International Journal of Food Science and Technology**, v.45, p.863-870, 2010.

SAÑUDO, C. et al. Regional variation in the hedonic evaluation of lamb meat from diverse production systems by consumers in six European countries. **Meat Science**, v.75, p.610-621, 2007.

SANTÉ-LHOUTELLIER, V. et al. Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and in vitro digestibility. **Meat Science**, v.79, p.777-783, 2008.

SASSE, A.; COLINDRES, P.; BREWER, M.S. Effect of Natural and Synthetic Antioxidants on the Oxidative Stability of Cooked, Frozen Pork Patties. **Journal of Food Science**, v.74, n.1, p.S30-S35, 2009.

SEABRA, L.M.A.J. et al. Fécula de mandioca e farinha de aveia como substitutos de gordura na formulação de hambúrguer de carne ovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.22, n.3, p.244-246, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v22n3/v22n3a08.pdf>>. Acesso em: 21 Mar. 2015.

SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C.M. Antioxidant Phytochemicals in Hazelnut Kernel (*Corylus avellana* L.) and Hazelnut Byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.1212-1220, 2007.

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

SILVA, L.F.; PIRES, C.C. Avaliações Quantitativas e Predição das Proporções de Osso, Músculo e Gordura da Carcaça em Ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa**, v.29, n.4, p.1253-1260, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v29n4/5643.pdf>>. Acesso em: 21 dez. 2008.

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

SOBRINHO, A.G.S. et al. Características de qualidade da carne de ovinos de diferentes genótipos e idades ao abate. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n.3, p.1070-1078, 2005.

STOCLET, J.C. et al. Vascular protection by dietary polyphenols. **European Journal of Pharmacology**, v.500, n.1-3, p.299-313, 2004.

TAN, W.; SHELEF, L.A. Effects of sodium chloride and lactates on chemical and microbiological changes in refrigerated and frozen fresh ground pork. **Meat Science**, v.62, p.27-32, 2002.

TAVARES, T.M.; SERAFINI, A. B. Carnes de hambúrgueres prontas para consumo: aspectos legais e riscos bacterianos. **Revista de Patologia Tropical**, v.35, n.1, p.1-2, 2006. Disponível em: <[http://www.iptsp.ufg.br/download/2006_35\(1\)01_21.pdf](http://www.iptsp.ufg.br/download/2006_35(1)01_21.pdf)>. Acesso em: 05 Set. 2010.

TERRA, N.N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo: Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS, 1998. 216p.

TERRA, N.N.; TERRA, A.B.M.; TERRA, L.M. **Defeitos nos produtos cárneos: origens e soluções**. São Paulo: Varela, 2004. 88p.

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

TRAORE, S. et al. Effect of heat treatment on protein oxidation in pig meat. **Meat Science**, v.91, p.14-21, 2012.

TRINDADE, R.A.; MANCINI-FILHO, J.; VILLAVIVENCIO, A.L.C.H. Effects of natural antioxidants on the lipid profile of electron beam-irradiated beef burgers. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.111, p.1161-1168, 2009.

VACCA, G.M. et al. Productive performance and meat quality of Mouflon x Sarda and Sarda x Sarda suckling lambs. **Meat Science**, v.80, p.326-334, 2008.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n.1, p.1-7, 2006.

VENTANAS, S. et al. Protein and lipid oxidation in Longissimus dorsi and dry cured loin from Iberian pigs as affected by crossbreeding and diet. **Meat Science**, v.72, p.647-655, 2006.

VIANA, J.G.A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, Porto Alegre, n.12, 2008.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Spices as Functional Foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.51, p.13-28, 2011.

WANASUNDARA, P.K.P.D., SHAHIDI, F. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects**. 6.ed., v.1, EUA: Wiley – Interscience, 2005.

WANG, J.; MAZZA, G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.15, p.4183-4189, 2002.

WERNER, F. **Fabricacion flable de embutidos: guia para el tecnico**. Zaragoza (Espanha): Acribia, 1983. 194p.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.49, p.4083-4089, 2001.

YOUNGSON, R. **Como combater os radicais livres: o programa de saúde dos antioxidantes**. Rio de Janeiro: Campus, 1995, 168p.

XIONG, Y. L.; PARK, D.; OOIZUMI, T. Variation in the cross-linking pattern of porcine myofibrillar protein exposed to three oxidative environments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.153-159, 2009.

ZEOLA, N.M.B.L. et al. Avaliação da injeção de cloreto de cálcio nos parâmetros qualitativos da carne de ovelha. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.11, n.3, p.361, 2005. Disponível em: <<http://www.ufpel.tche.br/faem/agrociencia/v11n3/artigo17.pdf>>. Acesso em: 19 Mar. 2015.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 5165-5170, 2001.

Capítulo 2

RESUMO

Avaliação da capacidade antioxidante de 13 extratos naturais através de métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP e seleção dos extratos promissores a partir de *Cluster analysis* e aceitação sensorial

O objetivo deste estudo foi a obtenção de 13 extratos naturais de ervas aromáticas e condimentos e posteriormente, avaliação da capacidade antioxidante para seleção dos mais promissores quanto à atividade antioxidante, a partir de Técnica multivariada por Análise de Agrupamentos (*Cluster Analysis*) e aplicação destes em produto cárneo para análise da aceitabilidade sensorial. Para tanto, inicialmente os extratos foram preparados utilizando uma mistura de solventes (70% acetona, 28% água ultra pura e 2% ácido acético glacial), sendo avaliados quanto aos fenólicos totais por ensaio de Folin-Ciocalteu e quanto à capacidade antioxidante total (TEAC) por métodos DPPH[•] e FRAP. Após a seleção dos extratos naturais por *Cluster Analysis*, que agrupou as amostras por similaridade de acordo com os valores obtidos para cada um dos métodos realizados, os extratos com maior capacidade antioxidante foram empregados na elaboração de hambúrgueres, que foram analisados sensorialmente por meio de testes afetivos (escala hedônica de nove pontos). Os valores TEAC variaram de 0,50-9,06 g equivalentes de trolox (ET)/100 g de peso seco (ps) e 43,61-472,32 $\mu\text{mol ET/g ps}$, respectivamente para DPPH[•] e FRAP, e o teor de fenólicos totais de 5,98-74,01 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g os, sendo *Origanum vulgare*, *Melissa officinalis*, *Origanum majorana* L. e *Rosmarinus officinalis*, os extratos selecionados inicialmente em relação aos três métodos colorimétricos. A incorporação destes quatro extratos não comprometeu a aceitação sensorial do hambúrguer em relação ao produto cárneo contendo o eritorbato de sódio ($P>0,05$). Concluiu-se que é possível substituir o antioxidante sintético em hambúrgueres de cordeiro por qualquer um dos quatro extratos naturais selecionados.

Palavras-chave: aceitabilidade sensorial, atividade antiradicalar, especiarias, fenólicos totais, hambúrguer ovino.

1 INTRODUÇÃO

A demanda por produtos mais saudáveis representa uma grande tendência em todo o mundo, sendo que as indústrias têm procurado novas formas de reduzir o uso de aditivos sintéticos, substituindo-os por alternativas naturais. Esta abordagem pode aumentar o tempo de vida de prateleira de alimentos, além de beneficiar a saúde, e, dependendo da fonte alternativa, realçar o sabor de alimentos (BREWER, 2011; CASTELLINI et al., 2002; HAYES et al., 2011).

Hoje em dia, os extratos de plantas são considerados como fontes importantes de antioxidantes na dieta, exercendo efeitos positivos na saúde humana e no processo de envelhecimento (DORMAN et al., 2004). O consumo de ervas e especiarias tem sido relacionado com promissores efeitos fisiológicos, tais como a prevenção de doenças cardiovasculares, carcinogênese, inflamações e aterosclerose, assim como propriedades hipoglicêmicas e hipocolesterolêmicas (SRINIVASAN, 2005). Essas propriedades têm sido atribuídas à presença de diversos compostos, tais como vitaminas, terpenóides, polifenóis, incluindo os flavonóides (SUHAJ, 2006).

Com o desenvolvimento de alimentos funcionais que produzem efeitos benéficos para a saúde, o interesse em antioxidantes naturais está em grande relevância entre os pesquisadores, fabricantes de alimentos e consumidores. Ervas e especiarias já eram muito utilizadas, desde os tempos antigos, devido às suas propriedades culinárias e medicinais (LORENZO et al., 2014; PATEIRO et al., 2014), e atualmente, os estudos sobre suas aplicações nos alimentos em relação aos antioxidantes sintéticos, tais como butil-hidroxitolueno (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), butilhidroquinona terciária (TBHQ) e eritorbato de sódio, estão cada vez maiores (CAPITANI et al., 2009; MADSEN e BERTELSEN, 1995).

Várias metodologias *in vitro* têm sido usadas para mensurar a capacidade antioxidante destas fontes naturais e sintéticas antes da adição na matriz alimentar. Ensaio de Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP são exemplos de métodos que determinam a estabilidade de radicais livres, de um metal de transição por transferência de elétrons ou de átomos de hidrogênio. Os resultados da análise de várias amostras a partir de diferentes métodos podem ser agrupados por técnicas estatísticas multivariadas, por exemplo, *Cluster analysis*, que classifica as amostras

em grupos de acordo com características semelhantes ou diferentes, minimizando assim, as diferenças existentes entre elas, sendo também aplicada para selecionar extratos com maior capacidade antioxidante (CAPITANI et al. 2009).

No entanto, além de apresentar boa capacidade antioxidante, extratos de ervas e especiarias também não devem prejudicar a aceitação sensorial dos alimentos em que são adicionados. Assim, os efeitos do presente estudo foram: a) obtenção e avaliação de 13 extratos de ervas com relação a capacidade antioxidante por três métodos colorimétricos diferentes, b) seleção dos extratos com melhor capacidade antioxidante em relação aos resultados dos três métodos, a partir de Técnica multivariada por Análise de Agrupamentos (*Cluster Analysis*) c) avaliação da aceitabilidade sensorial de hambúrgueres de cordeiro elaborados com os extratos naturais selecionados para comparação com o eritorbato de sódio, com o intuito de encontrar fontes alternativas e promissoras de antioxidantes para a indústria da carne.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matérias primas

Foram adquiridas 13 ervas e especiarias da empresa Flores e Ervas Comércio Farmacêutico LTDA, localizada na cidade de Piracicaba-SP, sendo embaladas a vácuo e armazenadas em local seco, escuro em temperatura ambiente até a preparação de extratos. Estas eram compostas por folhas, caules, sementes, flores ou raízes (rizomas), dispostas em forma de rasuras, exceto as sementes, caracterizando moagem grosseira:

- Açafrão (*Curcuma longa* L.) – rizoma
- Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) – folha
- Camomila (*Matricaria camomila*) – flor
- Erva doce (*Pimpinella anisum*) - semente
- Gengibre (*Zingiber officinalis*) – rizoma

- Hortelã (*Mentha piperita*) – folha + caule
- Louro (*Laurus nobilis*) – folha
- Manjerição (*Ocimum basilicum*) – folha
- Manjerona (*Origanum majorana* L.) – folha
- Melissa (*Melissa officinalis*) – folha
- Mostarda (*Brassica hirta*) – semente
- Orégano (*Origanum vulgare*) – folha
- Sálvia (*Salvia officinalis*) – folha

Todas as amostras apresentaram Laudos de Análises separadamente para o controle de qualidade exigido pela Vigilância Sanitária, sendo constituídos pelos seguintes dados:

- Informações gerais - número de lote, nomenclatura da amostra, nome científico, origem, parte utilizada, se passou ou não por etapa de esterilização, data de manufatura, número de lote de origem, validade do lote de origem pelo fornecedor e validade do lote;
- Aspectos macro e microscópicos (descrição);
- Características organolépticas (descrição) – cor, odor e sabor;
- Características físico-químicas (presença ou ausência e porcentagem) – aspecto, elementos estranhos, umidade, cinzas totais, cinzas insolúveis, metais pesados, pH, solubilidade, densidade, líquido extrator, teor alcoólico e resíduo seco;
- Testes de identificação (por colorimetria, espectrofotometria ou cromatografia);
- Características microbiológicas (presença ou ausência e contagem) – Contagem padrão em placas, bolores e leveduras, enterobactérias, Coliformes, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella sp.*;
- Teor de princípio ativo;
- Conclusão da análise (aprovação ou reprovação);
- Data da análise;

Em relação ao teor de umidade, fator muito importante devido à influência na extração e consequentemente na atividade antioxidante dos extratos, este apresentou-se ausente no hortelã e mostarda, para o orégano foi até 2% e para as demais amostras este teor era de até 1%, segundo Laudos de Análises fornecidos pela empresa.

Quanto aos cortes cárneos que foram utilizados para a elaboração dos hambúrgueres, estes foram adquiridos do Frigorífico VPJ Alimentos, localizado em Pirassununga-SP, sendo obtidas carnes de pescoço desossada (código 0024) e retalho gordo (código 0118), ambos oriundos de cortes de carcaças de cordeiros.

2.2 Preparo dos extratos naturais para realização das análises de capacidade antioxidante

Para a obtenção dos extratos vegetais, seguiu-se metodologia descrita por Michiels et al. (2012) com algumas modificações para aumentar a eficiência da extração. Para tanto, foi utilizada técnica convencional com o uso de uma mistura de solventes contendo 70% acetona, 28% água ultra pura e 2% ácido acético glacial que apresentam características intermediárias em relação à polaridade. A escolha pelo solvente extrator é justificada pelo estudo realizado por Xu e Chang (2007), que após testes com diferentes proporções de misturas de solventes como metanol, acetona, água, acidificadas ou não, concluíram que a mistura acidificada, contendo acetona e água, contribuiu significativamente para a solubilização de compostos fenólicos presentes nas matrizes vegetais.

A extração foi realizada em triplicata para cada amostra, sendo inicialmente realizada a trituração em homogeneizador Ultra-Turrax (TE-102, Tecnal, Brasil) durante 2 min a 16.000 rpm, seguindo-se uma relação de 1:20 em massa de planta (g) e volume de solvente (mL), conforme Michiels et al. (2012) e Abou-Arab e Abum-Salem (2010). Imediatamente as amostras foram mantidas sob agitação permanente em incubadora refrigerada “shaker” (TE-424, Tecnal, Brasil) por 60 min a 50 rpm e $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ e posteriormente centrifugadas em equipamento refrigerado (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Alemanha) durante 15 min a 4.000 rpm. O extrato bruto obtido foi filtrado com uso de papel filtro n.º 1 (125 mm Ø, Whatman) por 10 min, sendo o

volume final ajustado para 50 mL em balão volumétrico com solução extratora, obtendo-se extratos com concentração de 2% ou 0,02 g/mL, mesma utilizada em estudos de Ahn, Grün e Fernando (2002) e Rojas e Brewer (2008). As amostras foram homogeneizadas, transferidas para tubos falcon de 50 mL que foram vedados com *Parafilm M* e armazenados a -18°C até o momento da realização das análises de capacidade antioxidante.

Durante o processo de obtenção das amostras, estas eram vedadas com *Parafilm M* (Pechinery Plastic Packaging), permaneciam envolvidas com papel alumínio e mantidas em gelo, para evitar ao máximo a evaporação do solvente extrator e a ação da luz, que poderiam influenciar na eficiência da extração, bem como na integridade dos compostos antioxidantes presentes nos extratos (CAMPAGNOL et al., 2011).

2.3 Avaliação da capacidade antioxidante

Após a obtenção de cada um dos extratos, os ensaios de capacidade antioxidante foram realizados em triplicata no prazo de 3 dias através das metodologias colorimétricas para determinação de compostos fenólicos totais - Folin-Ciocalteu (GEORGÉ et al., 2005; SINGLETON e ROSSI, 1965), e capacidade antioxidante equivalente total a partir da inibição do radical DPPH[•] (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995; SÁNCHEZ-MORENO, 2002) e FRAP (*Ferric ion Reducing Antioxidant Power*) (BENZIE e STRAIN, 1996; BENZIE e STRAIN, 1999; PULIDO, BRAVO e SAURA-CALIXTO, 2000; THAIPONG et al., 2006), sendo posteriormente verificada a correlação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante.

2.3.1 Folin-Ciocalteu

Para a estimativa do conteúdo total de polifenóis, extratos de plantas (100 µL), diluídos quando necessário, foram misturados com 500 µL de reagente de

Folin-Ciocalteu a 10% e os *eppendorfs*, após homogeneização, foram mantidos em temperatura ambiente durante 2 min. Foram adicionados 400 μL de solução de carbonato de sódio 7,5% e as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 50°C por 15 min em banho maria (MA-27, Marconi, Brasil). Após arrefecimento, as leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (SP-22, Biospectro, Brasil) em comprimento de onda de 760 nm, usando cubetas de vidro com caminho óptico de 10 mm, sendo o equipamento zerado previamente com ensaio branco, contendo 100 μL de solvente extrator em substituição à amostra.

Considerando-se leituras de absorbância na faixa entre 0 e 1, a quantificação dos compostos foi determinada em relação ao modelo linear obtido a partir da curva padrão de calibração preparada com diferentes volumes de solução estoque de ácido gálico 100 $\mu\text{g/mL}$ (5 a 60 μL), sendo os resultados expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de peso seco (mg EAG/g ps).

2.3.2 Capacidade antioxidante equivalente total (TEAC)

Antes do início do ensaio com o radical DPPH $\cdot$, foram realizados testes para acompanhar o decaimento da absorbância de cada uma das amostras até atingir a estabilização, já que existe uma grande variação de períodos para leituras das absorbâncias entre os autores de vários trabalhos (DEMBELE et al., 2011; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; DENG, CHENG e YANG, 2011; DUDONNEÉ et al., 2009; FRATIANNI et al., 2010; MILIAUSKAS, VENSKUTONIS e VAN BEEK, 2004). Estes testes foram importantes para a padronização do tempo de reação com o radical DPPH $\cdot$.

Os ensaios foram preparados a partir da adição de 3.150 μL de solução metanólica do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH $\cdot$) 72 μM em associação com diferentes volumes de solvente extrator (180 a 350 μL) e de amostra (25 a 170 μL). Após homogeneização, as leituras das absorbâncias a 515 nm foram realizadas imediatamente no tempo zero, zerando-se o espectrofotômetro com metanol. As amostras foram mantidas em banho maria a 25°C e a diminuição das absorbâncias

foi determinada após 180 min, tempo este também reportado em estudos de Mielnik et al. (2008).

Os valores de absorbância obtidos dos ensaios foram utilizados na equação 1 para cálculo da porcentagem de inibição da banda de absorção do DPPH[•], sendo que Abs_A indica a absorbância do ensaio contendo a amostra no tempo de 180 min e Abs_B, a absorbância do ensaio branco no tempo zero, contendo apenas solução DPPH[•] 72 µM e solvente.

$$\% \text{ inibição} = \frac{(Abs_B - Abs_A)}{Abs_B} \times 100 \quad (1)$$

A curva padrão foi preparada com diferentes concentrações de solução trolox 500 µM (2,5 a 30 µM) e os resultados foram expressos em g equivalentes de trolox por 100 g de peso seco (g trolox/100 g ps).

O potencial antioxidante total da amostra também foi mensurado a partir da capacidade de redução férrica em que um potencial antioxidante promove a redução do íon férrico (Fe⁺³) ao íon ferroso (Fe⁺²), sendo esta reação comprovada pela formação de um complexo (Fe²⁺.TPTZ) de coloração azul, o que aumenta a absorção a 593 nm. O reagente FRAP foi preparado por mistura de tampão acetato de sódio (300 mM, pH 3,6), solução de 10 mM de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) em ácido clorídrico (HCl) 40 mM e 20 mM de cloreto férrico (FeCl₃.6H₂O), respectivamente na proporção de 10:1:1 (v/v/v). Este reagente (3.400 µL) foi homogeneizado com extratos de plantas (100 µL), seguindo-se a proporção de diluição no ensaio de 1/34. Os tubos de ensaio foram incubados em banho maria durante 30 min a 37°C e as leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 593 nm.

A quantificação dos compostos foi determinada em relação ao modelo linear obtido a partir da curva padrão de calibração preparada com diferentes concentrações de solução trolox 1000 µM (3 a 21 µM), sendo os resultados expressos como µmol equivalentes de trolox por g de peso seco (µmol trolox/g ps).

2.4 Cluster analysis

Para a seleção dos extratos mais promissores quanto às propriedades antioxidantes, os 13 extratos obtidos das especiarias estudadas foram avaliados por Técnica Multivariada a partir da Análise de Agrupamentos (*Cluster Analysis*), que agrupou as amostras por similaridade, de acordo com os resultados obtidos para capacidade antioxidante a partir de cada um dos métodos colorimétricos realizados (Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP).

2.5 Preparo dos extratos naturais para elaboração de hambúrgueres de cordeiro

Após a filtração total e preparo dos extratos iniciais, conforme já descrito anteriormente (subitem 2.2), foi realizada a concentração em evaporador rotativo (MA-120, Marconi, Brasil) sob pressão reduzida de -700 a -760 mmHg, por 140 min sob temperatura máxima de 45°C, em 3 etapas (35°C/50 min; 40°C/15 min e 45°C/75 min). Este equipamento foi acoplado em sistema contendo banho ultratermostático com circulador com rampas e patamares em temperatura de 5°C (Q214S, Quimis, Brasil) e vacuômetro e exaustor de gases (SL190, Solab, Brasil).

A temperatura da água do banho maria permaneceu até 45°C, já que em temperaturas superiores a 60°C pode ocorrer a decomposição e perda de antioxidantes devido ao aumento da volatilidade dos compostos (DECKER et al., 2005). De acordo com a literatura, as temperaturas mais comumente utilizadas no banho maria do rotaevaporador para eliminação de solventes e concentração de materiais vegetais variam de 35 a 50°C (ALVIM et al., 1999; BROINIZI et al., 2007; DAS et al., 2012; DJERIDANE et al., 2006; DUDONNEÉ et al., 2009; GHOLIVAND et al., 2010; LENTON, PERRY e SAUNDERS, 1971; LÔBO et al., 2008; MATOS et al., 2003; MELO et al., 2006; PAPADOPOULOS e BOSKOU, 1991; SAKANAKA, TACHIBANA e OKADA, 2005; WULFF e PASCHOLATI, 1998; YILDIRIM, MAVI e KARA, 2001), sendo que a faixa de temperatura utilizada no presente experimento foi controlada entre 35 a 45°C.

A concentração dos extratos facilita seu uso como aditivo alimentício (DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ e SANTOS, 2004), já que uma quantidade menor será requerida para a adição nos produtos cárneos a serem elaborados. Além disto, existe um limite de porcentagem de água a ser adicionado em produtos cárneos, de normalmente 20 a 30% em relação à quantidade de carne utilizada, pois define a capacidade de liga das proteínas e consequentemente da emulsificação da massa cárnea (LEMOS, 2002).

Todos os extratos concentrados foram distribuídos em béckeres de vidro contendo 20 mL de amostra, e estes foram submetidos à liofilização (LC-1500, Terroni, Brazil) por 24 hr. Após este procedimento, os extratos secos foram ressuspensos em 5 mL de água ultra-pura na razão de ¼ (v/v), dissolvidos em banho de ultrassom (Ultra Cleaner 1400, Unique, Brazil) por 10 min em temperatura máxima de 45°C e as amostras foram mantidas a -18°C, até o momento de elaboração dos produtos cárneos.

2.6 Cálculos de equivalência baseados em resultados de capacidade antioxidante

Foram realizados cálculos de equivalência dos quatro extratos naturais (orégano, manjerona, melissa e alecrim) em relação ao eritorbato de sódio com base nos resultados obtidos para avaliação da capacidade antioxidante a partir dos três métodos colorimétricos anteriormente citados (Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP). Para tanto, considerou-se a relação inicial de massa de planta (g) por quantidade de solvente (mL), quantidades de extrato obtidas inicialmente e após a concentração, liofilização e ressuspensão em água ultra-pura.

Isto permitiu determinar as concentrações de extrato antioxidante natural em ppm, bem como estabelecer as quantidades a serem adicionadas para a elaboração dos hambúrgueres em mL/kg de produto cárneo, com base na concentração normalmente aplicada de eritorbato de sódio em produtos cárneos (500 ppm). Neste caso, as quantidades de extratos naturais usadas foram determinadas por cálculos de conversão dos valores médios obtidos para os três métodos de capacidade antioxidante, em comparação aos valores de eritorbato de sódio.

2.7 Elaboração de hambúrgueres de cordeiro

Os hambúrgueres foram elaborados seguindo a Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000 (BRASIL, 2000a), que estabelece os Padrões de Identidade e Qualidade desta classe de produtos, sendo que estes deveriam apresentar em sua composição teores máximos de 23% de gordura e 3% de carboidratos e mínimo de 15% de proteínas.

Para atender a estes critérios, a elaboração foi realizada na Planta-Piloto de Produtos Cárneos do Matadouro-escola da USP de Pirassununga-SP, cuja formulação consistiu em carne de pescoço (84%) e retalhos de gordura (14%) de cordeiro, 2% de sal e antioxidantes naturais ou eritorbato de sódio (código 070076, Kerry, Brasil).

A carne e gordura de cordeiro foram descongeladas a $4\pm1^{\circ}\text{C}$ por 12 horas e picadas separadamente usando disco de 4 mm em moedor (Frigmann Hermann, Brasil), submetidas a homogeneização em misturador (Tecmafrig, Brasil), sendo preparados 5 kg por tratamento para cada uma das 3 repetições. Foram elaborados 5 tratamentos de acordo com fluxograma que pode ser visualizado na Figura 8, sendo um deles contendo eritorbato de sódio 500 ppm (ER) e mais 4 com extratos naturais (orégano, manjerona, melissa e alecrim), que foram selecionados previamente por *Cluster analysis*, em concentrações equivalentes ao ER.

Os produtos pesando entre 95-100 gramas foram moldados individualmente usando uma moldadora manual (HP 112, Picelli, Brasil) de 112 mm de diâmetro e 2 cm de altura separados individualmente com filmes de polietileno. Imediatamente, as amostras foram congeladas em ultra freezer (UCE-10, EcoClima, Brazil) por 40 min e embaladas por tratamento em sacos de polipropileno permeáveis, sendo posteriormente armazenados a -18°C em freezer vertical flex frost free (BVR 28/127, Brastemp, Brasil) e avaliados após 5 dias por meio de análises sensoriais propostas.

Figura 8 – Fluxograma de processamento do hambúrguer.

Fonte: Própria autoria.

2.8 Análises sensoriais

Para avaliar a aceitação sensorial foram recrutados 60 consumidores, entre alunos, docentes e funcionários da FZEA/USP, *campus* de Pirassununga-SP, em que o critério de seleção dos provadores foi justamente gostar de carne ovina e consumir produtos cárneos. Aos provadores recrutados foi fornecido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), que foi lido e assinado pelos mesmos antes da realização das análises, já que este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) (n.º 146.338) da mesma universidade em que foi realizado o teste.

Os hambúrgueres foram avaliados a partir do teste afetivo de aceitação utilizando escala hedônica de nove pontos (de 1 – “desgostei muitíssimo” a 9 –

“gostei muitíssimo”), conforme método descrito por Meilgaard, Civille e Carr (2006), sendo avaliado apenas o atributo de qualidade global.

Para tanto, as amostras foram fritas a 180°C em chapa elétrica (Croydon, Brasil) e viradas em intervalos de 2 min, totalizando 8 min, tempo em que atingiam temperatura interna de 72°C, controlada com termômetro infravermelho portátil (Raytek, MT4, Brasil). As amostras foram mantidas em estufa a 60°C por um tempo máximo de 30 min, sendo estas cortadas em 6 pedaços na diagonal e servidas monadicamente aos provadores em copos plásticos descartáveis codificados por números de três dígitos. A análise foi realizada em cabines individuais, iluminadas por luz branca seguindo delineamento em blocos casualizados completos.

2.9 Análises estatísticas e delineamento experimental

Os extratos naturais foram obtidos em 3 repetições, sendo os ensaios realizados em triplicata e os resultados expressos em média±erro padrão. Testes de correlação linear entre compostos fenólicos e atividade antioxidante foram realizados usando Microsoft Excel 2010 para Windows. Todos os resultados obtidos foram avaliados por análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa estatístico SAS (*Statistic Analysis System*), versão 9.1.3, sendo que, em caso de diferença significativa, as médias foram comparadas através do teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Além disto, os resultados de capacidade antioxidante também foram avaliados por Técnica Multivariada a partir da Análise de Agrupamentos (*Cluster Analysis*), que agrupou as amostras por similaridade, de acordo com os valores obtidos para cada um dos métodos realizados, reconhecendo a existência de grupos homogêneos e heterogêneos entre os extratos avaliados. Assim, foram definidos os extratos naturais a serem adicionados nos produtos cárneos, sendo elaborado um total de 50 hambúrgueres por repetição (5 tratamentos x 10 amostras/tratamento) que foram avaliados sensorialmente por 60 provadores, com resultados expressos em média±erro padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da capacidade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante para todos os métodos foi realizada com a diluição dos extratos, quando necessário, na mistura extratora antes do ensaio para que os valores das absorbâncias se apresentassem sempre na faixa entre 0 e 1 UA. Este intervalo de valores tem validade a partir da Lei de Lambert-Beer, o que permite a estimativa da concentração de uma solução por meio da relação linear com a absorbância (HARRIS, 2005).

3.1.1 Folin-Ciocalteu

A quantidade de fenólicos totais nos extratos avaliados, medida pelo método de Folin-Ciocalteu, a partir de curva padrão com ácido gálico ($y = 0,0113x - 0,0009$, $R^2 = 0,9984$) variou significativamente ($P < 0,001$) de 5,98 a 74,01 mg EAG/g ps (Tabela 1). O nível mais alto de compostos fenólicos foi encontrado em *Origanum vulgare*, enquanto a mais baixa foi em *Pimpinella anisum*. *Origanum majorana* L., *Rosmarinus officinalis* e *Melissa officinalis* também tinham níveis muito elevados de compostos fenólicos e não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre eles. Outras ervas com altos níveis de compostos fenólicos foram *Laurus nobilis* e *Salvia officinalis*. *Ocimum basilicum*, *Brassica hirta*, *Curcuma longa* L., enquanto que *Matricaria camomila* apresentaram níveis relativamente baixos de fenólicos, e *Mentha piperita* e *Zingiber officinalis*, valores bastante baixos.

Tabela 1 – Conteúdo de fenólicos totais em 13 extratos naturais (média±erro padrão).

Extrato	Família	Conteúdo de fenólicos totais
Oregano (<i>Origanum vulgare</i>)	Lamiaceae	74,01±4,23 ^a
Manjerona (<i>Origanum majorana</i> L.)	Lamiaceae	48,66±1,75 ^b
Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Lamiaceae	46,18±1,74 ^b
Melissa (<i>Melissa officinalis</i>)	Lamiaceae	42,86±1,76 ^{bc}
Sálvia (<i>Salvia officinalis</i>)	Lamiaceae	26,89±0,28 ^d
Louro (<i>Laurus nobilis</i>)	Lauraceae	37,26±1,22 ^c
Manjerição (<i>Ocimum basilicum</i>)	Lamiaceae	20,42±0,46 ^{de}
Mostarda (<i>Brassica hirta</i>)	Brassicaceae	20,40±0,21 ^{de}
Açafrão (<i>Curcuma longa</i> L.)	Zingiberaceae	17,53±0,15 ^{ef}
Camomila (<i>Matricaria camomila</i>)	Asteraceae	16,77±0,36 ^{ef}
Hortelã (<i>Mentha piperita</i>)	Lamiaceae	10,69±0,19 ^{fg}
Gengibre (<i>Zingiber officinalis</i>)	Zingiberaceae	8,93±0,36 ^g
Erva doce (<i>Pimpinella anisum</i>)	Apiaceae	5,98±0,05 ^g
Significância	-	***

Resultados expressos em mg equivalente ácido gálico (EAG)/g de peso seco.

^{a-g}Médias na mesma coluna não seguidas de mesma letra são significativamente diferentes ($P<0,05$; Teste de Tukey).

Significância: *** ($P<0,001$), ** ($P<0,01$), * ($P<0,05$), n.s. não significativo ($P\geq 0,05$). (n = 3).

Fonte: Própria autoria.

Entre as seis famílias testadas neste estudo, *Lamiaceae* (sete amostras), *Zingiberaceae* (duas amostras), *Lauraceae* (uma amostra), *Brassicaceae* (uma amostra), *Asteraceae* (uma amostra) e *Apiaceae* (uma amostra), *Lamiaceae* exibiu altos níveis de polifenóis (até 74,01 mg EAG/g de amostra seca). Existem muitos estudos na literatura envolvendo a atividade antioxidante de variadas ervas e especiarias da família *Lamiaceae*, cujos resultados foram em muitos deles mais promissores em relação a outras famílias (DANILA, GATEA e RADU, 2011; SPIRIDON et al., 2011; WOJDYLO, OSZMIANSKI e ECZEMERYS, 2007). Em comparação a estes trabalhos, os resultados obtidos no presente estudo indicam que as amostras apresentaram valores relativamente elevados, porém não muito altos em polifenóis para algumas delas.

O teor de fenólicos totais dos sete extratos desta família decresceram na seguinte ordem: orégano>manjerona>alecrim>melissa>sálvia>manjerição>hortelã, sendo que o primeiro apresentou cerca de 3,5 vezes maior teor de compostos em relação ao último. A análise estatística mostrou significativamente ($P<0,001$) diferenças entre essas especiarias, que podem ser devido a diferenças genotípicas

e ambientais (clima, localização, temperatura, fertilidade e exposição às pragas), ao cultivar, parte da planta, grau de maturação, condições de manejo, processamento e armazenamento, que em geral podem influenciar na reprodutividade dos métodos de análise (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006; DE OLIVEIRA et al., 2009; KIM e LEE, 2004; RAMALHO e JORGE, 2006; SHAN et al., 2005).

Os resultados do presente estudo estão de acordo com os relatados por Gawlik-Dziki (2012) que observou maior conteúdo fenólico a partir de extrato aquoso de orégano em comparação com o extrato de alecrim (177 vs. 94 mg EAG/g ps, respectivamente), assim como Pérez, Banek e Croci (2011) que também encontraram valores significativamente maiores em extratos aquosos e metanólicos de orégano com relação aos de sálvia. Contrariamente, Dorman et al. (2003) observaram quantidade de fenólicos maior nos extratos aquosos de alecrim (185 mg EAG/g ps), em comparação com os extratos de orégano e sálvia (149 vs. 166 mg EAG/g ps).

Por outro lado, gengibre e erva doce, respectivamente das famílias *Zingiberaceae* e *Apiacea* apresentaram valores mais baixos em fenólicos (8,93 vs. 5,98 mg EAG/g ps). Resultados semelhantes foram observados por Wongsu, Chaiwarit e Zamaludien (2012) que obtiveram, em geral, valores menores para espécies da família *Zingiberaceae* em comparação à *Lamiaceae*, com gengibre contendo 12,81 mg EAG/g ps. Estes resultados estão de acordo com os observados por Chan et al. (2008) que encontraram conteúdo fenólico menor em família *Zingiberaceae* (2,91, 2,42 e 1,62 mg EAG/g de peso fresco, para *Zingiber officinale*, *Z. spectabile* and *Z. ottensii*, respectivamente). Desta maneira, as diferenças nas quantidades de compostos bioativos podem ser afetadas também pelas origens das amostras, assim como relatado em estudo realizado por Javanmardi et al. (2003), com 23 amostras de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) oriundas de diferentes cidades do Irã, que após extração realizada com acetona e água, variaram entre 23,00 a 65,50 mg de ácido gálico/g ps.

3.1.2 Capacidade antioxidante equivalente total (TEAC)

Resultados obtidos para os dois métodos usados na mensuração da capacidade antioxidante dos extratos - FRAP e inibição de radical DPPH[•] - a partir de modelo linear com base na curva de calibração de trolox ($y = 0,0476x - 0,0280$, $R^2 = 0,9992$; e $y = 3,5464x - 2,2211$, $R^2 = 0,9940$, respectivamente) podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2 – Capacidade antioxidante equivalente total de 13 extratos naturais (média±erro padrão).

Extrato	Família	TEAC	
		DPPH [•]	FRAP
Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	Lamiaceae	9,06±0,06 ^a	472,32±9,21 ^a
Manjerona (<i>Origanum majorana</i> L.)	Lamiaceae	4,62±0,20 ^c	443,96±16,45 ^a
Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Lamiaceae	5,07±0,20 ^{bc}	361,57±19,47 ^b
Melissa (<i>Melissa officinalis</i>)	Lamiaceae	5,57±0,26 ^b	464,83±14,99 ^a
Louro (<i>Laurus nobilis</i>)	Lauraceae	3,23±0,10 ^d	157,15±5,18 ^d
Sálvia (<i>Salvia officinalis</i>)	Lamiaceae	2,59±0,10 ^e	231,60±5,48 ^c
Manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i>)	Lamiaceae	2,26±0,09 ^e	213,28±6,62 ^c
Mostarda (<i>Brassica hirta</i>)	Brassicaceae	0,57±0,005 ^g	45,90±0,56 ^e
Açafrão (<i>Curcuma longa</i> L.)	Zingiberaceae	0,96±0,01 ^g	45,25±0,17 ^e
Camomila (<i>Matricaria camomila</i>)	Asteraceae	1,25±0,05 ^f	153,94±3,35 ^d
Hortelã (<i>Mentha piperita</i>)	Lamiaceae	0,84±0,01 ^g	67,94±0,43 ^e
Gengibre (<i>Zingiber officinalis</i>)	Zingiberaceae	0,74±0,02 ^g	64,36±1,61 ^e
Erva doce (<i>Pimpinella anisum</i>)	Apiaceae	0,50±0,01 ^g	43,61±0,51 ^e
Significância	-	***	***

Resultados expressos em g equivalente trolox (ET)/100 g (DPPH[•]) e µmol ET/g de peso seco (FRAP).

^{a-g}Médias na mesma coluna não seguidas de mesma letra são significativamente diferentes ($P < 0,05$; Teste de Tukey)

Sign.= Significância: *** ($P < 0,001$), ** ($P < 0,01$), * ($P < 0,05$), n.s. não significativo ($P \geq 0,05$) ($n = 3$).

Fonte: Própria autoria.

Inicialmente, o decaimento de absorbância ao longo do tempo para a reação entre a solução estoque de DPPH[•] e cada um dos 13 extratos de ervas foram avaliados, em volumes variando de 25 a 170 µL, com objetivo de estabelecer o tempo reacional, conforme apresentado na Figura 9 para o extrato de orégano e para todas as amostras na Figura 10 com volumes de 170 µL. Para todas as amostras, observou-se um comportamento não-linear ao longo do tempo, porém com uma tendência similar de decaimento. Estes ensaios permitiram avaliar a variação de absorbância em função do tempo em diferentes volumes de amostra (Figura 11), determinando que aos 180 min a absorbância foi estabilizada, independentemente da quantidade de extrato utilizada.

Figura 9 – Curvas obtidas para ensaio de DPPH• com diferentes volumes de extrato de orégano ao longo tempo de reação (n = 3).

Fonte: Própria autoria.

Figura 10 – Cinética de estabilização para o ensaio DPPH• com diferentes extratos de ervas em mesmos volumes (170 µL) (n = 3).

Fonte: Própria autoria.

Figura 11 – Variação da absorbância em função do tempo obtida a partir dos resultados apresentados na Figura 9 (n = 3).

Fonte: Própria autoria.

Após este estudo das amostras em relação à estabilidade reacional, a atividade antioxidante total foi mensurada pelo ensaio DPPH•, variando significativamente ($P < 0,001$) de 0,50-9,06, apresentando uma média geral de 2,87 g ET/100 g ps.

Entre as seis famílias estudadas, *Lamiaceae* (sete amostras) e *Lauraceae* (uma amostra) apresentaram alta capacidade antioxidante significativa (médias gerais de 4,29 e 3,23 g ET/100 g ps, respectivamente). Assim, resultados para as outras quatro famílias foram significativamente ($P < 0,001$) inferiores. Entre as espécies estudadas, orégano apresentou maior capacidade antioxidante, de mais de 10 vezes em comparação a hortelã, sendo que comparativamente, as especiarias da família *Lamiaceae* indicaram que a capacidade antioxidante total diminuiu na seguinte ordem: orégano>melissa>alecrim>manjerona>sálvia>manjeriço>hortelã.

Estes resultados estão de acordo com os relatados por Shan et al. (2005) que observaram maior atividade antioxidante de extratos de orégano (1,01 mmol ET/g ps), em comparação com sálvia (0,52 mmol ET/g ps), alecrim (0,38 mmol ET/g ps) e manjeriço doce (0,30 mmol ET/g ps), mesmo comportamento verificado por Lagouri e Nisteroupoulou (2009), quanto aos extratos de orégano e manjeriço em relação à eficiência na inibição do radical DPPH•. Além disso, Tusevski et al. (2014), também

observaram maior atividade antioxidante em extratos de orégano (714,15 $\mu\text{mol ET/g ps}$) do que melissa (406,03 $\mu\text{mol ET/g ps}$). Contrariamente, Wojdylo, Oszmianski e Czemerys (2007) obtiveram maior atividade antioxidante em *Rosmarinus officinalis* (5,13 $\mu\text{M ET/g ps}$) do que em *Origanum vulgare* (0,80 $\mu\text{M ET/g ps}$) e *Melissa officinalis* (0,36 $\mu\text{M ET/g ps}$), enquanto Kim et al. (2011), confirmou melhor propriedade em extrato aquoso de alecrim com relação ao de orégano, apresentando este maior valor que o açafrão. Por fim, seguidamente ao orégano, as outras especiarias estudadas apresentaram valores para ensaios DPPH $^{\bullet}$ entre 1,25 e 5,57 g ET/100 g ps, enquanto que em apenas 5 os valores foram inferiores a 1 g ET/100 g ps.

A capacidade antioxidante total mensurada pelo método FRAP, variou significativamente ($P < 0,001$) de 43,61 a 472,32, apresentando uma média geral de 214,28 $\mu\text{mol ET/g ps}$. Segundo Wojdylo, Oszmianski e Czemerys (2007), de acordo com a capacidade de redução das amostras, estas podem ser divididas em cinco grupos: (a) FRAP muito baixa ($< 10 \mu\text{mol ET/g}$), $n = 0$; (B) baixo FRAP (10-50 $\mu\text{mol ET/g}$), $n = 3$; (C) bom FRAP (50-100 $\mu\text{mol ET/g}$), $n = 2$; (D) alto FRAP (100-400 $\mu\text{mol ET/g}$), $n = 5$; FRAP muito alta ($> 400 \mu\text{mol ET/g}$), $n = 3$.

Neste caso, dentre as amostras avaliadas, as propriedades antioxidantes mais altas foram observadas em três espécies de *Lamiaceae* (*O. vulgaris*, *M. officinalis* e *O. majorana* L.), representando estas as amostras com maior teor de substâncias redutoras. Entretanto, essas especiarias apresentaram maior capacidade na redução íon férrico (Fe^{+3}) ao íon ferroso (Fe^{+2}) do que na eliminação de radicais livres, conforme resultados obtidos para DPPH $^{\bullet}$, em que o orégano apresentou maior potencial.

No presente estudo, a maioria dos extratos reduziu íon férrico (Fe^{+3}) para 100-400 $\mu\text{mol ET/g ps}$, não apresentando capacidade de reduzir a valores inferiores a 10 $\mu\text{mol ET/g ps}$. No entanto, as habilidades mais fracas para reduzir íon férrico foram exibidas por mostarda, açafrão, hortelã, gengibre e erva doce, concordando exatamente com resultados obtidos para inibição de radical DPPH $^{\bullet}$, não diferindo entre eles em ambos os ensaios ($P > 0,05$). Quanto ao alecrim, este apresentou diferença significativa ($P < 0,001$), em comparação à todas as outras amostras, com uma média de 361,57 $\mu\text{mol ET/g ps}$.

Corroborando com os resultados do presente estudo para FRAP, Hinneburg, Dorman e Hiltunen (2006), verificando atividade antioxidante de vários extratos

aquosos, dentre eles, o manjeriço, louro, erva doce e gengibre, observaram que manjeriço e louro apresentaram melhores propriedades antioxidantes em relação a erva doce e gengibre, assim como também Katalinic et al. (2006), avaliando 70 plantas medicinais, notou maior poder redutor para melissa em comparação a hortelã, sálvia e alecrim.

3.2 Correlação entre o teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante

A possível correlação entre o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de extratos naturais foi estudada por vários autores que encontraram uma forte correlação linear (DORMAN et al., 2004; SHAN et al., 2005; ZHENG e WANG, 2001). Muitos estudos demonstram uma boa correlação entre métodos que apresentam um mesmo princípio químico - reação de óxido-redução – em que os compostos presentes na planta atuam como redutores ou determinantes da atividade antioxidante em extratos de ervas (DUDONNEÉ et al., 2009; HOSSAIN et al., 2010; HUANG, OU e PRIOR, 2005).

Neste caso, a análise de regressão linear simples foi utilizada para correlacionar o conteúdo de compostos fenólicos totais com as capacidades antioxidantes (DPPH[•] e FRAP), sendo que os coeficientes de correlação (r) foram calculados para os 13 extratos analisadas (Figura 12).

Figura 12 – Correlação linear entre conteúdo de fenólicos totais e capacidade antioxidante mensurada por métodos DPPH• (A) e FRAP (B) (n = 3).

Fonte: Própria autoria.

O valor de r entre os conteúdos de fenólicos totais e as capacidades antioxidantes obtidas a partir de ensaios DPPH• e FRAP foram respectivamente de 0,9706 e 0,8866. Tal valor elevado de r quanto ao DPPH• sugere que o poder de inibição do radical poderia ser previsto com base no ensaio de Folin-Ciocalteu para o conteúdo fenólico total o que poderia confirmar diretamente que os compostos fenólicos nas 13 plantas eram responsáveis pela sua capacidade antioxidante.

Assim, semelhante ao presente estudo, uma boa correlação entre o teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante por DPPH• e FRAP de extratos aquosos de orégano e sálvia foi observada também por Pérez, Banek e Croci

(2011), com r respectivamente de 0,936 e 0,898. Estes resultados também estão de acordo com os relatados por Wojdylo, Oszmianski e Czemerys (2007), quem observaram boas correlações entre a capacidade antioxidante obtida a partir de ensaio DPPH* e teor de compostos fenólicos ($r= 0,8352$) e entre ensaio FRAP e conteúdo fenólico ($r= 0,9100$) para algumas espécies da família *Lamiaceae*. Além disso, Katalinic et al. (2006) notaram uma alta correlação entre a quantidade de fenólicos totais e capacidade antioxidante obtida a partir de ensaio FRAP ($r= 0,9825$) em estudo envolvendo 70 extratos de plantas medicinais. No entanto, Wongs, Chaiwarit e Zamaludien (2012) não encontraram uma boa correlação entre a capacidade antioxidante obtida por ensaio DPPH* e teor de compostos fenólicos ($r= 0,02$), indicando que neste caso, estes compostos não contribuíram para a atividade antioxidante das ervas estudadas. Este comportamento confirma que a capacidade antioxidante de extratos de plantas não se limita apenas a presença de compostos fenólicos (JAVANMARDI et al., 2003), podendo ser originária de outros metabólitos antioxidantes secundários, tais como óleos voláteis, carotenóides e vitaminas (WONGSA, CHAIWARIT e ZAMALUDIEN, 2012).

3.3 Cluster analysis

A partir desta análise de agrupamentos, as amostras foram agrupadas por similaridade, sendo que o dendrograma gerado por esta técnica multivariada resultou em três grupos bem definidos, em ordem decrescente (Figura 13).

Figura 13 – Cluster analysis dos 13 extratos com destaque para o grupo 1 (n = 3).

Fonte: Própria autoria.

O primeiro grupo é composto por orégano, manjerona, melissa e alecrim, sendo estas espécies associadas com o alto teor de fenólicos totais e uma forte atividade antioxidante conforme determinada por ensaios DPPH[•] e FRAP. Um segundo grupo foi composto por louro, camomila, manjerição e sálvia, sendo este caracterizado por moderada quantidade de fenólicos e capacidade antioxidante, enquanto que hortelã, gengibre, erva doce, açafrão e mostarda foram classificados em um terceiro grupo, contendo um baixo teor de compostos fenólicos e fraca capacidade antioxidante.

3.4 Cálculos dos volumes dos extratos naturais selecionados para a elaboração de hambúrgueres de cordeiro

De acordo com os resultados de *Cluster analysis*, o primeiro grupo composto por orégano, manjerona, melissa e alecrim foi selecionado para a elaboração dos hambúrgueres de cordeiro. Usando os mesmos métodos colorimétricos de capacidade antioxidante, os resultados obtidos para eritorbato de sódio foram $608,83 \pm 26,93$ mg de EAG/g, $100,24 \pm 1,20$ g ET/100 g e $7044,53 \pm 153,77$ μ mol ET/g ps para Folin-Ciocalteu, inibição do radical DPPH[•] e FRAP, respectivamente.

Assim, as concentrações (ppm) dos extratos naturais a serem adicionadas nos produtos cárneos foram determinadas pela conversão dos valores médios obtidos pelos três métodos de capacidade antioxidante, em comparação aos resultados obtidos para a capacidade antioxidante do eritorbato de sódio 500 ppm. A partir destes cálculos de equivalência, os volumes de extrato para a elaboração dos hambúrgueres (mL/kg de produto cárneo) foram definidos (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados de equivalências e volumes de extratos naturais em relação ao eritorbato de sódio 500 ppm (médias $\pm$ erro padrão).

Extrato antioxidante	Equivalência (ppm)	Volume (mL/kg)
Orégano	$5710,75 \pm 92,17$	$18,37 \pm 0,64$
Manjerona	$8376,80 \pm 334,40$	$26,51 \pm 1,99$
Melissa	$7916,89 \pm 316,93$	$26,62 \pm 0,65$
Alecrim	$8774,63 \pm 374,71$	$29,69 \pm 1,29$

(n = 3).

Fonte: Própria autoria.

Outros autores também têm avaliado a aplicação de antioxidantes naturais em produtos cárneos. No entanto, esses estudos geralmente não trazem informações sobre como as quantidades adicionadas foram definidas ou calculadas. Na maioria dos estudos as concentrações aplicadas seguem percentuais com base em resultados satisfatórios obtidos por outros estudos ou indicações de extratos comerciais (AKARPAT, TURHAN e USTUN, 2008; OZOGUL e UÇAR, 2013; TRINDADE, MANCINI-FILHO e VILLAVIVENCIO, 2009).

3.5 Análises sensoriais

Para a avaliação sensorial, entre os provadores selecionados, 71,67% eram do sexo feminino e 61,67% tinham entre 20 e 40 anos de idade. A aceitação de diferentes amostras pelos provadores não diferiu ($P>0,05$) para o atributo de qualidade global (Tabela 4).

Tabela 4 – Teste de aceitação de hambúrgueres de cordeiro elaborados com diferentes antioxidantes (média±erro padrão).

Tratamento	Qualidade global
Manjerição	6,95±1,44 ^a
Eritorbato de sódio	6,88±1,44 ^a
Orégano	6,87±1,44 ^a
Alecrim	6,85±1,44 ^a
Melissa	6,42±1,44 ^a

^aMédias na mesma coluna seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes ($P<0,05$; Teste de Tukey). n = 60 provadores/tratamento/repetição.

Fonte: Própria autoria.

Em geral, os valores médios atribuídos permaneceram próximos de 7,0 ("gosto moderadamente") para todas as amostras. Os resultados demonstraram que hambúrgueres com antioxidantes naturais foram tão bem aceitos quanto aqueles contendo o antioxidante normalmente adicionado pelas indústrias de carne, ou seja, eritorbato de sódio. Além disso, entre os quatro extratos vegetais avaliados, nenhum foi melhor ou pior avaliado. Em outras palavras, a análise sensorial não permitiu a seleção de apenas um dos extratos, o que significa que qualquer um deles pode ser adicionado ao hambúrguer de cordeiro, sem comprometimento da aceitabilidade

sensorial, corroborando com estudos de Bozkurt (2006), que verificaram que a adição de extrato de chá verde, óleo de *T. spinata* ou extrato de chá verde combinado com óleo de *T. spicata* em linguiça seca fermentada turca, não afetou a qualidade sensorial global no dia zero de armazenamento ($P>0,05$) em relação às amostras controle e contendo BHT.

Similarmente, de acordo com muitos outros estudos, a adição de extratos naturais, não afetou os atributos sensoriais globais em comparação ao tratamento controle. Beal et al. (2011) avaliaram efeitos de extratos de folhas de mate em diferentes concentrações, eritorbato de sódio e controle (sem antioxidante) em produtos fermentados tipo italiano, armazenados a 18 °C durante 60 dias, sendo que a qualidade global não foi afetada pela adição do extrato em relação aos outros dois tratamentos. De acordo com Lara et al. (2011), diferenças nos atributos sensoriais entre os lotes (controle, BHT, extratos de alecrim e melissa) também não foram notadas pelos provadores em hambúrgueres suínos cozidos embalados em atmosfera modificada e armazenados por 6 dias a $4\pm1^{\circ}\text{C}$.

Em resumo, este estudo demonstrou que os resultados apoiam ainda mais a visão de que algumas especiarias são fontes promissoras de antioxidantes naturais. Conteúdo de fenóis totais e capacidade antioxidante total diferem significativamente entre os 13 extratos estudados. Em seguida, *Cluster analysis* foi útil e permitiu a seleção dos melhores extratos com base nos resultados de diferentes métodos de capacidade antioxidante, sendo que, entre os 13 extratos vegetais avaliados, os melhores resultados foram obtidos para orégano, manjerona, melissa e alecrim. A partir dos resultados obtidos na avaliação sensorial de hambúrgueres de cordeiro elaborados com os extratos selecionados, pode-se concluir que as quatro ervas aromáticas representam uma boa alternativa e uma solução bastante viável para a substituição de antioxidante sintético.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que os extratos de orégano, manjerona, alecrim, melissa, louro, sálvia, manjerição, mostarda, açafrão, camomila, hortelã, gengibre e erva doce apresentaram considerados teores de compostos fenólicos, sendo esses

correlacionados a atividade antioxidante avaliada pelos ensaios de DPPH^{*} e FRAP, sendo que os extratos de orégano, manjerona, melissa e alecrim apresentaram melhores resultados e podem ser incorporados ao hambúrguer sem alterar a aceitabilidade sensorial do produto.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-ARAB, E.A.; ABU-SALEM, F.M. Effect of natural antioxidants on the stability of ostrich meat during storage. **Grasas y Aceites**, v.61, n.1, p.102-108, 2010.

AHN, J., GRÜN, I.U.; FERNANDO, L.N. Antioxidant properties of natural plant extracts containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. **Journal of Food Science**, v.67, n.4, p.1364-1369, 2002.

AKARPAT, A.; TURHAN, S.; USTUN, N.S. Effects of hot-water extracts from myrtle; rosemary, nettle and lemon balm leaves on lipid Oxidation and color of beef patties during frozen storage. **Journal of Food processing and preservation**, v.32, p.117-132, 2008.

ALVIM, N.R. et al. Efeitos biológicos da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e da *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze (Amaranthaceae). **Acta Scientiarum**, v.21, n.2, p.349-352, 1999.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, p.191-203, 2006.

BEAL, P. et al. Oxidative stability of fermented Italian-type sausages using mate leaves (*Ilex paraguariensis* St. Hil) extract as natural antioxidant. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.62, p.703-710, 2011.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, v.299, p.15-23, 1999.

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**, v.239, p.70-76, 1996.

BOZKURT, H. Utilization of natural antioxidants: Green tea extract and Thymbra spicata oil in Turkish dry-fermented sausage. **Meat Science**, v.73, p.442-450, 2006.

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

BRASIL. Instrução Normativa n.º 20, de 31 de julho de 2000. Dispõe sobre os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de hambúrguer. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília-DF, jul. 2000a.

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

BROINIZI, P.R.B. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.4, p.902-908, 2007.

CAMPAGNOL, P.C.B. et al. The effect of yeast extract addition on quality of fermented sausages at low NaCl content. **Meat Science**, v.87, p.290-298, 2011.

CAPITANI, C.D. et al. Evaluation of natural and synthetic compounds according to their antioxidant activity using a multivariate approach. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.111, p.1090-1099, 2009.

CASTELLINI, C.; MUGNAI, C.; DAL BOSCO, A. Effect of organic production system on broiler carcass and meat quality. **Meat Science**, v.60, p.219-225, 2002.

CHAN, E.W.C. et al. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. **Food Chemistry**, v.109, p.477-483, 2008.

DANILA, A.O.; GATEA, F.; RADU, G.L. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs. **Chemistry of Natural Compounds**, v.47, p.21-26, 2011.

DAS, A.K. et al. *Moringa oleifera* leaves extract: a natural antioxidant for retarding lipid peroxidation in cooked goat meat patties. **International Journal of Food Science and Technology**, v.47, p.585-591, 2012.

DECKER, E.A. et al. Measuring Antioxidant Effectiveness in Food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4303-4310, 2005.

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

DEMBELE, S. et al. Comparison study of the effects of different crude green tea polyphenols on the quality of dried catfish during ambient storage. **Journal of Food Process Engineering**, v.34, p.566-579, 2011.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH[•] assay. **Food Chemistry**, v.125, p.1430-1435, 2011.

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

DJERIDANE, A. et al. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, v.97, p.654-660, 2006.

DORMAN, H.J.D. et al. Characterization of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, v.83, p.255-262, 2003.

DORMAN, H.J.D. et al. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.762-770, 2004.

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

DUDONNEÉ, S. et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH*, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.1768-1774, 2009.

FRATIANNI, F. et al. Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. **Journal of Food Science**, v.75, n.8, p.M528-M535, 2010.

GAWLIK-DZIKI, U. Dietary spices as a natural effectors of lipoxygenase, xanthine oxidase, peroxidase and antioxidant agents. **LWT- Food Science and Technology**, v.47, p.138-146, 2012.

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

GHOLIVAND, M.B. et al. Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton canescens*. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.24-28, 2010.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. LTC: Rio de Janeiro, 2005. Cap.18, p.876.

HAYES, J.E. et al. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. **Food Chemistry**, v.126, p.948-955, 2011.

HINNEBURG, I.; DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, v.97, p.122-129, 2006.

HOSSAIN, M.B. et al. Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiceae herbs. **Food Chemistry**, v.123, p.85-91, 2010.

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

JAVANMARDI, J. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**, v.83, p.547-550, 2003.

KATALINIC, V. et al. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**, v.94, p.550-557, 2006.

KIM, I.-S. et al. Antioxidant Activities of Hot Water Extracts from Various Spices. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p.4120-4131, 2011.

KIM, D.O.; LEE, C.Y. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, p.253-273, 2004.

LAGOURI, V.; NISTEROPOULOU, E. Antioxidant properties of *O. Onites*, *T. vulgaris* and *O. basilicum* species grown in Greece and their total phenol and rosmarinic acid content. **Journal of Food Lipids**, v.16, p.484-498, 2009.

LARA, M.S. et al. Evaluation of two natural extracts (*Rosmarinus officinalis* L. and *Melissa officinalis* L.) as antioxidants in cooked pork patties packed in MAP. **Meat Science**, v.88, p.481-488, 2011.

LEMOS, A.L.S.C. Ingredientes e aditivos no processamento de embutidos. In: LEMOS, A.L.S.C.; YAMADA, E.A. **Princípios do Processamento de Embutidos Carneos**. Campinas: CTC/ITAL, 2002. p.11-26.

LENTON, J.R.; PERRY, V.M.; SAUNDERS, P.F. The identification and quantitative analysis of abscisic acid in plant extracts by gas-liquid chromatography. **Planta**, v.96, p.271-280, 1971.

LÔBO, L.T. et al. Potencial alelopático de catequinas de *tachigali myrmecophyla* (leguminosae). **Química Nova**, v.31, n.3, p.493-497, 2008.

LORENZO, J.M. et al. Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties. **Meat Science**, v.96, p.526-534, 2014.

MADSEN, H.L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, v.6, p.271-277, 1995.

MATOS, L.G. et al. Atividades analgésica e/ou antiinflamatória da fração aquosa do extrato etanólico das folhas da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (manacá). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p.15-16, 2003.

MEILGAARD, M.C.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory Evaluation Techniques**. 4. Ed. CRC Press: Boca Raton, 2006. 448p.

MELO, A.F.M. et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.202-205, 2006.

MICHIELS, J.A. et al. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. **Food Chemistry**, v.130, p.986-993, 2012.

MIELNIK, M.B. et al. By-products from herbs essential oil production as ingredient in marinade for turkey thighs. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, p.93-100, 2008.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN BEEK, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v.85, p.231-237, 2004.

OZOGUL, Y.; UÇAR, Y. The effects of natural extracts on the quality changes of frozen chub mackerel (*Scomber japonicus*) burgers. **Food and Bioprocess Technology**, v.6, p.1550-1560, 2013.

PAPADOPOULOS, G.; BOSKOU, D. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.68, n.9, 1991.

PATEIRO, M. et al. Effect of addition of green tea, chestnut and grape extract on the shelf-life of pig liver pâté. **Food Chemistry**, 147:386-394, 2014.

PÉREZ, M.B.; BANEK, S.A.; CROCI, C.A. Retention of antioxidant activity in gamma irradiated argentinian sage and oregano. **Food Chemistry**, v.126, p.121-126, 2011.

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

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

ROJAS, M.C.; BREWER, M.S. Effect of natural antioxidants on oxidative stability of frozen, vacuum-packaged beef and pork. **Journal of Food Quality**, v.31, p.173–188, 2008.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, v.8, n.3, p.121-137, 2002.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; OKADA, Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). **Food Chemistry**, v.89, p. 569–575, 2005.

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

SPIRIDON, L.; BODIRLAU, R.; TEACA, C.-A. Total phenolic content and antioxidant activity of plants used in traditional Romanian herbal medicine. **Central European Journal of Biology**, v.6, p.388-396, 2011.

SRINIVASAN, K. Role of spices beyond food flavouring: nutraceuticals with multiples health effects. **Food Reviews International**, v.21, p.167-188, 2005.

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

SUHAJ, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.531-537, 2006.

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

TRINDADE, R.A.; MANCINI-FILHO, J.; VILLAVIVENCIO, A.L.C.H. Effects of natural antioxidants on the lipid profile of electron beam-irradiated beef burgers. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.111, p.1161-1168, 2009.

TUSEVSKI, O. et al. Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. **Central European Journal of Biology**, v.9, n.9, p.888-900, 2014.

XU, B.J.; CHANG, S.K.C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**, v.72, n.2, p.159-166, 2007.

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

WONGSA, P.; CHAIWARIT, J.; ZAMALUDIEN, A. In vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against α -amylase and α -glucosidase of culinary herbs in Thailand. **Food Chemistry**, v.131, p.964-971, 2012.

WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S.F. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, n.1, p.138-143, 1998.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.49, p.4083-4089, 2001.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.5165-5170, 2001.

Capítulo 3

RESUMO

Avaliação da estabilidade oxidativa durante armazenamento de hambúrguer de cordeiro com adição de *Origanum vulgare* em diferentes concentrações

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da adição de diferentes concentrações de extrato de orégano, em relação à estabilidade oxidativa de hambúrgueres de cordeiro armazenados sob congelamento, bem como definir a concentração mais promissora a partir de métodos de determinação da capacidade antioxidante. Para tanto, foram elaborados 5 tratamentos: controle (CO), contendo eritorbato de sódio (ER) e três concentrações de extrato de orégano (N1 = 4139,82 ppm, N2 = 5529,34 e N3 = 7463,08), definidas a partir de cálculos de equivalência em relação ao eritorbato de sódio 500 ppm, de acordo com resultados de capacidade antioxidante (Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP). O extrato natural foi obtido por método convencional utilizando-se uma mistura de solventes (70% acetona, 28% água ultra pura e 2% ácido acético glacial), a partir de trituração, agitação, centrifugação, filtração, concentração, liofilização e ressuspensão em água. Inicialmente os hambúrgueres foram caracterizados quanto à composição centesimal, sendo submetidos à análises de estabilidade durante 120 dias para avaliação de parâmetros físico-químicos [substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), índice de peróxidos, oxidação de proteínas (carbonilas e tióis), cor objetiva, pH, perfil de textura (TPA), perda de água por cocção (PAC), redução de diâmetro (RD) e poder redutor], microbiológicos (psicotróficos aeróbios, coliformes a 45°C, estafilococos coagulase positiva, clostrídios sulfito-redutores e *Salmonella*) e sensoriais (escala hedônica de 9 pontos). Não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) com relação a TPA, PAC e RD durante o período estudado. Entretanto, o índice de vermelho (a^*) diferiu ($P < 0,001$) entre os tratamentos, resultando em valores mais altos nas amostras contendo extrato de orégano em relação ao CO, além de que N2 e N3 apresentaram valores inferiores de pH aos 120 dias ($P < 0,05$). Quanto ao TBARS, CO apresentou o maior índice (5,85 mg MDA/kg de amostra), e N3, o menor valor (1,12 mg MDA/kg), com 80% de redução ($P < 0,001$). O índice de peróxidos também diferiu em relação aos tratamentos ($P < 0,001$), influenciando na formação dos compostos secundários. Além disto,

quanto à oxidação protéica, maiores efeitos antioxidantes foram obtidos nos tratamentos com extrato natural ($P < 0,01$), assim como para o poder redutor, em que CO e ER apresentaram menor potencial de redução em comparação aos contendo orégano ($P < 0,05$). No entanto, não foram detectadas diferenças microbiológicas significativas ($P > 0,05$) entre tratamentos, permanecendo em condições adequadas de comercialização durante todo o período. Sensorialmente, amostras CO foram rejeitadas pelos provadores (nota abaixo de 5) após 120 dias quanto ao atributo sabor, porém hambúrgueres com adição de antioxidantes, mantiveram boa aceitação em relação a todos os atributos. Conclui-se que o extrato de orégano pode substituir o antioxidante sintético como uma alternativa natural viável para efeitos satisfatórios de conservação do hambúrguer de cordeiro, mantendo a funcionalidade do antioxidante adicionado, sendo N3 a concentração considerada mais eficiente, baseada no método FRAP de determinação da capacidade antioxidante.

Palavras-chave: capacidade antioxidante, congelamento, extrato de orégano, vida útil, saudabilidade.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente extratos de plantas são bastante estudados quanto à presença de compostos bioativos, pelos quais, podem ampliar o tempo de vida útil, garantindo a qualidade e segurança de alimentos que se tornam mais saudáveis. De acordo com Afolabi, Efere e Ebenezer (2010), estudos recentes têm demonstrado resultados muito satisfatórios quanto ao potencial de antioxidantes naturais, originados a partir de extratos de ervas e especiarias com aplicação em diversos tipos de alimentos para preservação de suas propriedades, bem como influenciando positivamente em relação ao desenvolvimento de algumas doenças.

Hoje em dia, o desenvolvimento de produtos funcionais é visto como um grande aliado ao bem-estar e saúde da população, incluindo principalmente produtos cárneos que são uma excelente fonte de proteínas de alta qualidade, além de aminoácidos essenciais (ZHANG et al., 2010). Além disso, carnes e seus derivados são uma das fontes de gordura mais relevantes na dieta (TRINDADE, MANCINI-FILHO e VILLAVIVENCIO, 2009), sendo que o processo oxidativo pode influenciar negativamente nos atributos cor, sabor, odor e textura destes alimentos, reduzindo valor nutricional e consequentemente, prejudicando a aceitação pelo consumidor (COLINDRES e BREWER, 2011).

Produtos congelados, por exemplo, hambúrgueres, como avaliado no presente estudo, são mais susceptíveis à deterioração oxidativa em comparação à degradação microbiológica, sendo comumente detectada formação de ranço neste tipo de alimento. Neste caso, alterações oxidativas irreversíveis afetam diretamente a qualidade, já que estão associadas à descoloração (GEORGANTELIS et al., 2007).

Devido a maior busca pelo *Clean Label*, muitos estudos envolvendo a substituição dos antioxidantes sintéticos por alternativas naturais estão sendo realizados, apresentando estes efeitos satisfatórios quanto a inibição da oxidação de biomoléculas facilmente oxidáveis, como lipídeos e proteínas (BAGCHI et al., 2000; JIA et al., 2012; NAVEENA et al., 2008). Assim, por possuírem um alto teor de polifenóis, tais como ácidos fenólicos, flavonóides e compostos aromáticos (SÁNCHEZ-ESCALANTE et al., 2003), matrizes vegetais são consideradas uma

ótima fonte natural para extensão da vida de prateleira sem afetar a qualidade nutricional e sensorial de produtos cárneos (NUNEZ DE GONZALEZ et al., 2008).

Ervas e especiarias são muito utilizadas na China e Índia e mundialmente conhecidas desde muitos séculos atrás, principalmente pela melhoria nas características organolépticas e de conservação. O orégano, em especial, tem sido relatado na literatura como um ingrediente com alta atividade antioxidante, além de antibacteriana, fungicida, antiviral, nematicida, antioxidante, antimutagênica e espasmolítica. *Origanum vulgare* L., é uma planta aromática e medicinal da família *Lamiaceae*, cujas propriedades estão cientificamente comprovadas por diversos estudos (LUKAS e NOVAK, 2013; SÁNCHEZ-ESCALANTE et al., 2003).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da adição de diferentes concentrações de extrato natural de orégano com relação à estabilidade físico-química, microbiológica e sensorial de hambúrgueres de cordeiro armazenados a -18°C por 120 dias, bem como definir a concentração mais promissora em função dos resultados obtidos por diferentes métodos colorimétricos de determinação da capacidade antioxidante (Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matérias primas (VER Capítulo 2 – subitem 2.1)

2.2 Preparo de extrato natural de orégano para análises de capacidade antioxidante e posterior elaboração de hambúrgueres de cordeiro (VER Capítulo 2 – subitens 2.2 e 2.5)

Cluster analysis, apesar de agrupar os extratos similares quanto a capacidade antioxidante determinada pelos métodos colorimétricos (Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP), revelou em ordem decrescente que o orégano foi o extrato que apresentou valores numéricos mais favoráveis em comparação às outras três amostras

(manjerona, melissa e alecrim), sugerindo que possivelmente este poderia ser o extrato natural mais promissor para a extensão da vida útil de produtos cárneos.

2.3 Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de orégano e eritorbato de sódio por métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH^{*} e FRAP (VER Capítulo 2 – subitens 2.3.1 e 2.3.2)

Algumas adaptações foram necessárias devido à solubilidade dos reagentes, bem como também às propriedades do próprio antioxidante. O eritorbato de sódio por apresentar característica hidrossolúvel foi dissolvido em água ultra-pura para a realização dos ensaios de determinação da capacidade antioxidante, sendo este solvente utilizado para os métodos realizados, exceto para a curva padrão do FRAP e DPPH^{*}, em que o reagente trolox foi dissolvido em álcool 70%, já que este é insolúvel em água.

2.4 Cálculos de equivalência baseados em resultados de capacidade antioxidante (VER Capítulo 2 – subitem 2.6)

Neste caso, as três quantidades de extrato natural foram determinadas por cálculos de conversão dos resultados obtidos para cada um dos três métodos de capacidade antioxidante, em comparação aos valores de eritorbato de sódio.

2.5 Determinação do pH do extrato de orégano

O pH do extrato de orégano foi mensurado em triplicata a partir de pHmetro (UB-10, Denver Instrument, EUA) com eletrodo combinado com sonda de temperatura.

2.6 Análise de cromatografia gasosa por técnica de headspace para quantificação de resíduo de acetona no extrato de orégano

Após a solubilização do extrato de orégano em água ultra pura, este foi submetido em triplicata à análise de cromatografia gasosa (GCMS-QP 2010 Plus, Shimadzu, Japão) utilizando-se a técnica de headspace (AOC-5000 auto injector, Shimadzu, Japão) para análise dos compostos voláteis. Para tanto, utilizou-se coluna cromatográfica específica (Rtx-5MS, Restek, EUA) crossbond 5% *diphenyl* e 95% *dimethyl polysiloxane*, contendo 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de revestimento.

Para a adequação do método de rastreamento do solvente seguiu-se metodologia de Ligor e Buszewski (2008) com adaptações, sendo que inicialmente foi realizada a injeção de um padrão contendo solução aquosa de acetona em concentração de 40 ppm para verificação dos fragmentos de íons, tempo de retenção destes picos e de volatilização da acetona.

Foi realizada a incubação de 4 mL de amostra a 40°C/10 min em tubos de 20 mL (22,5 x 75 mm) contendo lacre de alumínio com selo magnético de 20 mm, sendo o volume de injeção de gás (headspace) de 500 µL em temperatura de 220°C (porta de injeção em 210°C).

O procedimento foi realizado em modo *split* 1/100 µL (volume de amostra diluída em volume de gás) com fluxo de injeção de gás de 1 mL/min com faixa de varredura de m/z entre 35 e 450 e pressão de 49,5 kPa. O tempo do início da leitura foi de 1 min, em temperatura inicial de 40°C, sendo a fonte de ionização aquecida em 10°C/min até atingir uma temperatura final de 200°C na coluna cromatográfica, totalizando 16 min.

A Curva Padrão de calibração foi construída com base na densidade de soluções de acetona, em concentrações de 5, 20, 40, 60 e 75 ppm, considerando-se seu grau de pureza (99,5%). A partir das áreas resultantes dos picos obtidos, a quantificação do resíduo deste solvente foi determinada no extrato de orégano, e consequentemente no produto cárneo final.

2.7 Elaboração de hambúrgueres de cordeiro

Os hambúrgueres foram elaborados conforme já descrito no Capítulo 2 – subitem 2.7. No entanto, neste caso, foram elaborados 5 tratamentos em 3 processamentos realizados separadamente: controle, sem adição de antioxidante (CO), contendo eritorbato de sódio 500 ppm (ER), e três com diferentes concentrações de extrato antioxidante natural de orégano, determinadas de acordo com cálculos de equivalência em relação ao eritorbato de sódio 500 ppm, para cada um dos métodos colorimétricos – N1 = Folin-Ciocalteu; N2 = DPPH^{*} e N3 = FRAP – respectivamente com volumes em ordem crescente. Para tanto, foram preparados 3 kg por tratamento em cada uma das 3 repetições, sendo requerido mais 25 kg por repetição, para a realização da análise sensorial.

Para avaliação da estabilidade, os produtos cárneos foram submetidos às análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais propostas, sendo duas amostras por tratamento avaliadas em zero, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento a -18°C, conforme descritas a seguir. Para todas as análises, exceto perda de água por cocção, redução do diâmetro, perfil de textura e sensoriais, os hambúrgueres eram descongelados previamente durante 3 h a 4°C.

2.8 Análises físico-químicas

2.8.1 Composição centesimal

A metodologia oficial de Horwitz e Latimer (2007) foi utilizada para determinação de umidade (A.O.A.C. 950.46) e resíduo mineral fixo ou cinzas (A.O.A.C. 920.153). O teor de lipídeos foi determinado pelo método de Folch, Lees, e Sloane Stanley (1957) e proteínas por método de Dumas (A.O.A.C. 992.15) utilizando-se sistema completo para determinação de nitrogênio/proteína por combustão rápida (FP-528, Leco, Brasil).

Para cada repetição, os ensaios das análises foram realizados em triplicata a partir da trituração de uma amostra de cada tratamento dos tempos zero, em processador de alimentos (RI7620, Philips Walita, Brasil) por 2 min, totalizando aproximadamente 500 gramas de amostra. Todos os resultados foram expressos em porcentagem (%).

2.8.1.1 Umidade

Para umidade, as amostras foram pesadas (4 a 5 gramas) em placas de Petri utilizando-se balança analítica (AX 200, Shimadzu). A carne foi submetida a estufa de secagem (Fanem, Brasil) à $105\pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo feita a pesagem em intervalos pré-determinados de tempo, até que a diferença de massa entre duas pesagens sucessivas não excedesse 0,1% da massa da amostra.

2.8.1.2 Cinzas

Inicialmente, cadinhos de cerâmica foram lavados e calcinados por um período de 24 horas em mufla (MA 385, Marconi) à 550°C . Amostra orgânica oriunda da determinação da umidade (1 a 1,5 g), foram submetidas a mufla em mesma temperatura até os resíduos se tornarem brancos, para posterior pesagem em balança analítica e cálculo da quantidade de minerais totais presentes.

2.8.1.3 Lipídeos

Quanto a porcentagem de lipídeos, 7,50 g de amostra foram homogeneizadas com 25 mL de solução clorofórmio:metanol (7:3, v/v) em homogeneizador Turrtec (TE-102, Tecnal, Brasil) por 2 min em 16.000 rpm. Em seguida, adicionou-se 10 mL de água ultra pura, sendo agitadas vigorosamente pelo mesmo tempo e centrifugadas (5810-R, Eppendorf, Alemanha) a 4°C por 3 min em 4000 rpm. A fase inferior composta por lipídeos e clorofórmio foi recolhida sendo adicionado 1 g de sulfato de sódio anidro P.A. e esta mistura filtrada em filtro de papel n.º 1 (125 mm Ø, Whatman). As amostras (2 mL) foram submetidas a secagem, permanecendo em estufa a 105±1°C até determinação do peso constante.

2.8.1.4 Proteínas

O método de Dumas é comparável ao tradicional método de Kjeldahl, porém este é determinante de todas as formas de nitrogênio (N₂), orgânicas e inorgânicas, apresentando-se muito eficiente e prático (JUNG et al., 2003; KING-BRINK e SEBRANEK, 1993). Para tanto, pesou-se 25 gramas de cada uma das amostras, sendo estas submetidas a temperatura de 950°C até a combustão rápida em presença de oxigênio puro. O carbono da amostra foi convertido em dióxido de carbono (CO₂) e os subprodutos, nitrogênio e seus óxidos, foram carregados para um sistema de filtração termoeletrônico para remoção do teor de umidade. Uma alíquota dos gases resultantes foi submetida a um sistema catalisador para remoção dos gases interferentes e o N₂ foi quantificado por diferença de condutividade térmica ao gás hélio puro. O sistema, controlado por um software operacional do Windows, determinou a porcentagem de N₂, convertido em conteúdo de proteína usando fator de conversão de 6,25.

2.8.2 Cor objetiva e estimativa indireta de metamioglobina

Utilizou-se colorímetro portátil (MiniScan XE, HunterLab, EUA) através da escala L^* , a^* , b^* do sistema CIE- $L^*a^*b^*$ (CIE, 1976), com iluminante D_{65} , ângulo de observação de 10° e abertura de célula com 30 mm, para obtenção dos valores médios de 6 leituras de 2 amostras por tratamento, após 10 min de exposição ao ar atmosférico. Além disto, foram também obtidos os índices de intensidade de cor ou croma [$C^* = (b^{*2} + a^{*2})^{0,5}$] e tonalidade ou ângulo Hue [$H^* = \tan^{-1}(b^*/a^*) \cdot 57,29$] (HUNT et al., 1991; RIPELL et al., 2013), e foi feita a estimativa de metamioglobina de acordo com Pearce et al. (2010) e Toohey et al. (2008).

2.8.3 pH

As medidas de pH foram realizadas usando um pHmetro de perfuração (HI 99163, Hanna, Brasil) com eletrodo combinado para leitura em triplicata de 2 amostras por tratamento, perfurando-se 3 pontos diferentes por amostra.

2.8.4 Perda de água por cocção (PAC) e redução de diâmetro (RD)

A perda de água por cocção (PAC) e a redução de diâmetro dos hambúrgueres foram realizados de acordo com método descritos por Fernandes et al. (2014) e Jung e Joo (2013), respectivamente.

Inicialmente duas amostras de cada um dos tratamentos foram pesadas em balança analítica (Ohaus Adventurer, Brasil) e o diâmetro foi medido em três pontos de cada um dos hambúrgueres com o uso de um metro graduado (BERRY, 1992).

As amostras foram preparadas conforme descrito em Capítulo 1 – subitem 2.8, sendo posteriormente a PAC determinada por diferença de peso, considerando-se $[(\text{massa do hambúrguer cru} - \text{massa do hambúrguer frito}) / \text{massa do hambúrguer cru}] \times 100$, além da realização da medida dos diâmetros considerando-se $[(\text{diâmetro do hambúrguer cru} - \text{diâmetro do hambúrguer frito}) / \text{diâmetro do hambúrguer cru}] \times 100$.

2.8.5 Análises de perfil de textura (TPA)

Após cocção, cada hambúrguer foi cortado individualmente em 6 pedaços de 2x2x1 cm, retirando-se as laterais, totalizando 12 amostras de cada tratamento, sendo submetidas a determinação do perfil de textura de acordo com García, Calvo e Selgas (2009) e Jung e Joo (2013).

Estas análises foram realizadas em Texturômetro TA.XT Plus (Texture Analyser, Stable Micro Systems, EUA) a 25°C, por testes de compressão axial com uma sonda cilíndrica de 20 mm de diâmetro movendo-se a velocidade constante de 2 mm/s, até uma deformação de 50%, determinando-se os valores de dureza (kg), elasticidade (mm), coesividade, gomosidade (kg x mm), mastigabilidade (kg) e resistência.

2.8.6 Oxidação lipídica

2.8.6.1 TBARS

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram avaliadas em duplicata de acordo com metodologias descritas por Sorensen e Jorgensen (1996) e Vyncke (1970; 1975), com alterações. Para tal, 5 g de amostras foram homogeneizadas em 15 mL de solução contendo ácido tricloroacético (TCA) 7,5%, propil galato (PG) 0,1% e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,1% em equipamento ultra-turrax (T18 basic, Ika, Alemanha). O homogenato foi filtrado em papel filtro n.º 1 (125 mm Ø, Whatman) e 3 mL foi adicionado com mesma quantidade de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA). Após 40 min em banho maria ultratermostatizado (CT 265, CIENTEC, Brasil) a 100°C, as leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro (DU 800, Beckman Coulter, EUA) a 532 e 600 nm. Os valores de TBARS foram calculados a partir de curva de calibração de malonaldeído com solução padrão de 1,1,-3,3 tetraetoxipropano (TEP) em

concentrações de 0,06 a 3 mL e os resultados foram expressos como mg de malonaldeído (MDA)/kg de amostra.

2.8.6.2 Índice de peróxidos

O índice de peróxidos foi determinado segundo metodologia de Shantha e Decker (1994), sendo as amostras contendo lipídeos obtidas de acordo com o procedimento descrito anteriormente (subitem 2.8.1.3).

Os ensaios foram realizados a partir de 1 mL de amostra e 1 mL de solução de ferro⁺²/tiocianato, sendo avaliados espectrofotometricamente a 500 nm após 5 min. Os peróxidos foram quantificados a partir de curva de calibração contendo solução padrão de ferro⁺³ 20 µg/mL (50 a 1000 µL), solução clorofórmio:metanol (7:3, v/v) e solução de ferro⁺²/tiocianato, seguindo-se a fórmula: (absorbância)/55,84 x m x mo x 2, onde 55,84 = massa atômica do ferro; m = coeficiente linear da equação da reta obtida; mo = massa da amostra (g); 2 = fator de conversão de miliequivalentes de ferro para miliequivalentes de peróxidos. Os resultados foram expressos em miliequivalentes (mEq.) de peróxidos/kg de lipídeos.

2.8.7 Oxidação protéica

2.8.7.1 Carbonilas

A mensuração do conteúdo de grupos carbonílicos foi realizada segundo Levine et al. (1990) e Mercier, Gatellier e Renerre (2004), com adaptações. Inicialmente foi realizada a extração das proteínas, a partir da homogeneização de 3 g de amostra com 30 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0) por 1 min (T18 basic, Ika, Alemanha). Após centrifugação por 15 min a 4°C e a 4000 rpm,

pesou-se 0,1000 g do precipitado e o teor de proteínas totais foi calculado com base na curva padrão de reagente de biureto a 540 nm (0 a 4 mg/mL).

Alíquotas de 100 μ L dos precipitados (20 mg/mL) foram separadamente homogeneizadas com 500 μ L de HCl 2M, para quantificação de proteínas, e com 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) 10 mM em HCl 2M, para teor de carbonilas, sendo mantidas em temperatura ambiente por 1 h, agitadas a cada 15 min. Posteriormente foi adicionado 500 μ L de solução TCA 20% e a mistura centrifugada a 11000 $\times g$ por 10 min a 4°C. Após descarte dos sobrenadantes, as amostras eram lavadas 3 vezes com 1 mL de solução de etanol e acetato de etila (1:1, v/v), sendo homogeneizadas até dissolução. Após secagem *overnight*, em temperatura ambiente, os precipitados foram dissolvidos em 1 mL de solução de guanidina HCl 6M em fosfato de potássio dibásico 20 mM (pH 2,3), incubados em banho maria por 15 min a 50°C e submetidos a centrifugação durante 10 min a 11000 $\times g$ e 4°C para remoção de partículas insolúveis.

Ensaio em duplicata foram submetidos a leituras em absorbâncias de 280 e 370 nm (DU 800, Beckman Coulter, EUA) e a quantificação de carbonilas foi determinada usando o coeficiente de extinção molar DNPH (22.000 M⁻¹.cm⁻¹), com base na curva de calibração de albumina (0 a 20 mg/mL) e os resultados foram expressos em nmol de carbonilas/mg de proteína.

2.8.7.2 Tióis livres

Para quantificar os tióis foi utilizado 5,5-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) seguindo-se metodologias de acordo com Ellman (1959), Liu e Xiong (2000); Srinivasan e Hultin (1997), com modificações. O método consiste na extração das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares a partir de solução contendo uréia 8M, dodecil sulfato de sódio (SDS) 3% e solução tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,4).

Para tanto, os precipitados inicialmente obtidos para o ensaio de carbonilas foram pesados (0,1000 g) e submetidos à diluição para uma concentração final de 1 mg/mL de proteína, com base em mesma curva padrão de reagente de biureto citada anteriormente. Alíquotas de 500 μ L de amostra diluída foram

homogeneizadas com 2 mL de solução tampão uréia/SDS e 500 µL de DTNB 10 mM em fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,4), sendo os tubos incubados em temperatura ambiente por 15 min. Os ensaios foram realizados em duplicata sendo avaliados a partir da absorbância do DTNB a 412 nm e os resultados, calculados com base no coeficiente de extinção molar de $13.600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, foram expressos em nmol de tiol por mg de proteína.

2.8.8 Avaliação da manutenção antioxidante do extrato de orégano no hambúrguer de cordeiro

Análises de poder redutor foram realizadas em duplicata em função de cada tratamento nos tempos 0 e 120 dias, para se verificar a manutenção da capacidade antioxidante do extrato no produto cárneo de acordo com método de Huang et al. (2011). Para tanto, amostras de hambúrguer (0,03 g) foram homogeneizadas com 200 mL de solução tampão de fosfato de sódio 2,5 mM (pH 6,6) e 2,5 mL de cianeto de potássio férrico 1%. A mistura foi submetida a agitação durante 2 min em agitador de tubos e incubados a 50°C por 20 min em banho maria (27-MA, Marconi, Brasil). Em seguida, 2,5 mL de ácido tricloroacético 10% (v/v) foi adicionado e a mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 8 min, sendo 0,5 mL do sobrenadante resultante homogeneizado com 0,5 mL de água ultra pura e 100 µL de cloreto férrico.

A absorbância da solução resultante foi mensurada a 700 nm após 10 min, sendo a quantificação realizada a partir de curva de calibração preparada com BHA (0,005 mg/mL) e os resultados expressos em mg equivalentes de BHA/g de amostra.

2.8.9 Análises microbiológicas

A abertura das embalagens, a retirada, a pesagem da unidade analítica e toda inoculação foram realizadas no interior de câmara de fluxo laminar, e todos os instrumentos e utensílios foram mergulhados em etanol 70% e flambados no momento do uso. Foram retiradas assepticamente 25 g da amostra em pedaços

pequenos de diversos pontos superficiais inferiores e superiores da amostra, sendo estes homogeneizados em saco estéril juntamente a 225 mL de água peptonada previamente esterilizada, sendo esta a diluição 10^{-1} . A partir desta, foram preparadas diluições decimais seriadas até 10^{-3} transferindo-se 1 mL da anterior a um tubo com 9 mL de água peptonada, sendo cada uma delas plaqueada em duplicata (SILVA et al. 2010).

As análises microbiológicas foram realizadas no tempo zero e aos 120 dias de estocagem para as 3 repetições, para verificar a qualidade do hambúrguer de acordo com padrão microbiológico determinado pela legislação (BRASIL, 2001). Assim, foram realizadas análises de contagem total de psicotróficos aeróbios de acordo com Silva et al. (2010) e Vanderzant e Splittstoesser (1992), através de A.O.A.C. 990.12, coliformes termotolerantes a 45°C, conforme Horwitz e Latimer (2007), através de A.O.A.C. 998.08, estafilococos coagulase positiva pelo método A.O.A.C. 2003.11, Clostrídios Sulfito-redutores, através de metodologia descrita por e Silva et al. (2010), e *Salmonella* através de método rápido a partir de pré-enriquecimento (A.O.A.C. 2003.09), seguindo-se Kushida (2005).

2.8.9.1 *Psicotróficos aeróbios*

Na determinação de psicotróficos aeróbios foi seguido o método oficial A.O.A.C. nº 990.12, utilizando como meio de cultura as placas *Petrifilm*TM (3M, Brasil). Para a inoculação dos meios, as placas foram dispostas sobre superfícies planas, levantando-se o filme superior da placa e inoculando-se 1 mL da diluição das amostras, sendo as placas incubadas a $7\pm 1^\circ\text{C}$ por 10 dias (MA415, MARCONI, Brasil). Para a leitura foram selecionadas as placas contendo entre 25 a 250 colônias e os resultados foram expressos em UFC/g de amostra.

2.8.9.2 *Coliformes termotolerantes a 45°C*

Na determinação de coliformes foi utilizado o método oficial A.O.A.C. nº 998.08, utilizando como meio de cultura as placas *Petrifilm*TM (3M, Brasil). Para a inoculação das diluições, as placas foram dispostas sobre superfícies planas, levantando-se o filme superior da placa e inoculando 1 mL da diluição das amostras, sendo as placas incubadas a $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas em B.O.D. umidificada (MA415, MARCONI, Brasil). Em presença de colônias e após a contagem destas, as placas deveriam ser novamente incubadas por mais 24 horas com o intuito de observar o crescimento de novas colônias. Para a leitura, foram selecionadas as placas contendo entre 15 a 150 colônias e a contagem foi expressa em UFC/g de amostra.

2.8.9.3 *Estafilococos coagulase positiva*

Para a sua determinação foi seguido o método oficial A.O.A.C. nº 2003.11, utilizando como meio de cultura as placas *Petrifilm*TM Staph Express (3M, Brasil), que foram incubadas em temperatura entre 35 a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas (MA415, MARCONI, Brasil). Após este período foi observada a formação de colônias nas placas, sendo que em caso negativo, o teste era finalizado. Em presença de colônias vermelho-violetas, estas deveriam ser contadas como *Staphylococcus aureus*. Já no caso de ocorrer crescimento de colônias mistas (vermelho-violetas, pretas e/ou azuis-esverdeadas) deveria ser realizada uma confirmação com Disco *Petrifilm*TM Staph Express (3M, Brasil), sendo as placas incubadas novamente por 1 a 3 horas na mesma temperatura citada anteriormente. Após este período, somente colônias com desenvolvimento de halos rosados deveriam ser contados e identificados como *S. aureus*. Para a leitura foram selecionadas as placas contendo o limite de 150 colônias e a contagem foi expressa em UFC/g de amostra.

2.8.9.4 *Clostrídios sulfito-redutores*

Para determinação de clostrídios sulfito redutores, utilizou-se placas prontas contendo ágar TSC (código 540185, Laborclin, Brasil), aprovadas pela Agência Nacional da Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), além do uso de sobrecamadas contendo 10 mL de ágar TSC (código 530169, Laborclin, Brasil).

Foi realizada a inoculação de 1 mL das diluições selecionadas na superfície das placas de Petri e em seguida estas alíquotas foram cobertas com uma sobrecamada de Ágar TSC suplementado com 0,1 mL de solução de cicloserina 4%. Após a completa solidificação do ágar, as placas foram acondicionadas em jarros sem inverter (Probac, Brasil) contendo sistemas geradores de anaerobiose e posteriormente incubadas em B.O.D. (MA415, MARCONI, Brasil) a 46°C por 18 a 24 horas. Em presença de colônias pretas típicas, deveria ser realizada confirmação com Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), método de esfregaço da cultura para coloração de Gram e/ou teste de catalase. Para a leitura foram selecionadas placas contendo entre 25 a 250 colônias e a contagem foi expressa em UFC/g de amostra.

2.8.9.5 *Salmonella*

A análise de *Salmonella* foi feita através do BAX® System da Dupont/Qualicon, baseada na automação das análises de alimentos por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), conforme método descrito por Kushida (2005). O BAX® possui inúmeras vantagens já que é totalmente automatizado, sendo a detecção rápida e sensível. O “kit” completo possui todos os reagentes na forma de tabletes, que requer apenas um período de enriquecimento, seguida da lise e aplicação do PCR, que demanda 4 horas adicionais. O pré-enriquecimento da amostra foi realizado em água peptonada 1% (diluição 10^{-1}) incubada por 18 a 24 horas a 35°C. Após esse período, foram transferidos 5 µL de cada amostra para tubos contendo 200 µL de tampão de lise. Os tubos foram fechados e colocados em banho maria a 37°C por 20 min, posteriormente a 95°C por 10 min e em seguida transferidos para banho em água com gelo por 5 min. Após este processo, as amostras poderiam ser congeladas para serem submetidas ao final do ensaio do processo de PCR.

2.8.10 Análises sensoriais

Análises sensoriais foram realizadas conforme já descritas no Capítulo 2 – subitem 2.8. No entanto, neste caso, foram avaliados os atributos aroma, textura, suculência, sabor e qualidade global (Figura 14).

Nome: _____		Data: ____ / ____ / ____	Ficha ____
Você está recebendo uma amostra de HAMBÚRGUER OVINO . Por favor, avalie o produto e marque na escala o quanto você gostou ou desgostou das seguintes características:			
Número da amostra _____		Nota	
ESCALA 1-Detestei 2-Desgostei muito 3-Desgostei moderadamente 4-Desgostei ligeiramente 5-Nem gostei/nem desgostei 6-Gostei ligeiramente 7-Gostei moderadamente 8-Gostei muito 9-Adorei	AROMA		Comentários:
	TEXTURA		Comentários:
	SUCULÊNCIA		Comentários:
	SABOR		Comentários:
	QUALIDADE GLOBAL		Comentários:

Figura 14 – Ficha utilizada para avaliação das amostras de hambúrguer de cordeiro (n = 60).

Fonte: Própria autoria.

2.8.11 Análises estatísticas e delineamento experimental

Para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos naturais, os ensaios para cada uma das 3 repetições foram realizados em triplicata e os resultados expressos em média $\pm$ erro padrão, enquanto que para avaliação da estabilidade dos produtos cárneos, os ensaios das 3 repetições foram realizados em duplicata utilizando delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 5, ou seja, 5 tratamentos (CO, ER, N1, N2 e N3) avaliados em 5 tempos de estocagem (0, 30, 60, 90 e 120 dias), cujos resultados também foram expressos em média $\pm$ erro padrão. Os resultados finais obtidos foram avaliados por análise de variância (ANOVA), utilizando-se o pacote estatístico SPSS 17.0 (IBM Corporation, Chicago, IL, USA),

sendo que, em caso de diferença significativa, as médias foram comparadas através do teste de Duncan, ao nível de 5% de significância. As correlações entre as variáveis foram determinadas por análise de correlação através do coeficiente de correlação linear de Pearson com o pacote de software estatístico mencionado anteriormente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de orégano e eritorbato de sódio por métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH^{*} e FRAP (VER Capítulo 2 – subitens 3.1.1 e 3.1.2)

Resumidamente, os resultados obtidos em relação à capacidade antioxidante do extrato de orégano e eritorbato de sódio a partir dos métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH^{*} e FRAP podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5 – Capacidade antioxidante de extrato de orégano e eritorbato de sódio (média±erro padrão).

Método	Extrato natural	Eritorbato de sódio
Folin-Ciocalteu ¹	74,01±4,23	608,83±26,93
DPPH [*] 2	9,06±0,06	100,24±1,20
FRAP ³	472,32±9,21	7044,53±153,77

¹Resultados expressos em mg equivalente ácido gálico/g; ²Resultados expressos g equivalente trolox (ET)/100 g; ³Resultados expressos em µmol ET/g de peso seco. (n = 3).

Fonte: Própria autoria.

Pode-se observar que o antioxidante sintético apresentou valores superiores aos do extrato natural para os 3 métodos avaliados. Isto se deve ao fato de que o eritorbato de sódio é um composto puro, enquanto o extrato de orégano é constituído por uma determinada porcentagem de compostos antioxidantes por grama de planta seca. Diante aos valores obtidos, muitos estudos afirmam a alta capacidade antioxidante do extrato de orégano em relação a outras ervas. Aranha e Jorge (2012) e Gawlik-Dziki (2012) afirmam este grande potencial do extrato de

orégano, apresentando quanto ao Folin-Ciocalteu valores de 72,87 e 177 mg EAG/g de amostra, respectivamente. Para justificar as diferenças encontradas no segundo estudo, os primeiros autores citam que este comportamento se deve provavelmente ao solvente utilizado para a realização da extração.

3.2 Cálculos de equivalência baseados em resultados de capacidade antioxidante (VER Capítulo 2 – subitem 3.4)

Resultados de equivalência em ppm para o extrato de orégano com relação ao eritorbato de sódio em concentração de 500 ppm, de acordo com cada método colorimétrico, podem ser visualizados na Tabela 6, sendo definidos os volumes em mL/kg de produto cárneo.

Tabela 6 – Resultados de equivalências e volumes de extrato de orégano em relação ao eritorbato de sódio 500 ppm (média±erro padrão).

Método	Equivalência (ppm)	Volume (mL/kg)
Folin-Ciocalteu	4139,82±233,33	13,32±0,75
DPPH [•]	5529,34±36,50	17,79±0,12
FRAP	7463,08±148,26	24,01±0,48

(n = 3).

Fonte: Própria autoria.

3.3 Análise de cromatografia gasosa por técnica de headspace para quantificação de resíduo de acetona no extrato de orégano

A partir dos volumes de extrato determinados por cálculos de equivalência com base nos resultados para Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP, e considerando-se as áreas dos picos de acetona obtidos a partir da curva de calibração, as concentrações do resíduo de acetona no produto cárneo final foram de 0,38±0,02 (N1), 0,51±0,003 (N2) e 0,69±0,01 ppm (N3), permanecendo portanto, abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira, de 2 ppm (BRASIL, 1999).

3.4 Determinação do pH do extrato de orégano

Foi realizada mensuração do pH do extrato de orégano utilizado para a elaboração dos produtos cárneos, obtendo-se valor médio de $3,98 \pm 0,03$.

3.5 Determinação da composição centesimal de hambúrgueres de cordeiro

Resultados para a composição centesimal foram $62,06 \pm 0,49$; $2,52 \pm 0,05$; $22,62 \pm 0,79$ e $15,21 \pm 0,21\%$, respectivamente para umidade, cinzas, lipídeos e proteínas, permanecendo no limite máximo e mínimo, respectivamente para lipídeos (23%) e proteínas (15%) conforme Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Hambúrguer (BRASIL, 2000).

3.6 Estabilidade físico-química

3.6.1 Cor objetiva e estimativa indireta de metamioglobina

Quanto aos parâmetros instrumentais de cor, estes foram mensurados na superfície dos hambúrgueres de cordeiro durante 120 dias de armazenamento, conforme pode ser visualizado na Tabela 7. Com relação aos valores de a^* (cor vermelha) observou-se uma diminuição significativa ($P < 0,01$), bem como uma tendência de queda quanto ao índice de b^* (cor amarela) e de croma (intensidade da cor), juntamente com aumento significativo nos valores Hue (tonalidade da cor) ($P < 0,05$), que são atribuídos à oxidação gradual do átomo de ferro dentro do grupo heme, levando à transformação da oximioglobina vermelha (OxyMb) em metamioglobina acastanhada (MetMb) (FAUSTMAN et al., 2010).

Tabela 7 – Parâmetros de cor de hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C (média±erro padrão).

Tratamento		Tempo de armazenamento (dias)					Sign.
		0	30	60	90	120	
L*	CO	46,41±2,19	48,04±0,79	47,54±2,77	48,52±2,13	49,15±3,32	n.s.
	ER	46,70±1,96	48,06±1,57	47,33±2,89	48,01±2,40	48,49±2,86	n.s.
	N1	46,78±1,91	48,39±0,85	46,60±2,73	49,53±1,52	47,25±2,49	n.s.
	N2	47,61±1,93	47,87±1,33	47,71±2,35	48,09±2,17	48,27±2,34	n.s.
	N3	47,25±1,86	48,70±1,20	47,63±2,17	48,15±2,24	48,21±2,54	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
a*	CO	9,17±0,33 ^d	5,06±0,24 ^{c1}	3,87±0,57 ^{bc}	2,98±0,36 ^{ab1}	2,48±0,45 ^{a1}	***
	ER	8,30±0,55 ^b	6,35±0,21 ^{a2}	5,40±0,41 ^a	5,54±0,29 ^{a3}	5,64±0,45 ^{a3}	**
	N1	9,21±0,35 ^d	5,74±0,18 ^{c1,2}	4,93±0,17 ^b	3,97±0,19 ^{a2}	3,88±0,32 ^{a2}	***
	N2	8,64±0,45 ^c	5,31±0,22 ^{b1}	4,56±0,01 ^{ab}	4,24±0,30 ^{a2}	3,89±0,27 ^{a2}	***
	N3	7,97±0,17 ^c	5,35±0,29 ^{b1}	4,70±0,30 ^{ab}	4,15±0,17 ^{a2}	3,90±0,29 ^{a2}	***
	Sign.	n.s.	*	n.s.	**	**	
b*	CO	16,51±0,49	15,79±0,18 ²	15,40±0,25	15,40±0,26	15,23±0,80	n.s.
	ER	14,98±0,39	14,36±0,37 ¹	14,57±0,44	14,47±0,53	14,69±0,42	n.s.
	N1	16,27±0,45 ^b	14,45±0,28 ^{a1}	14,21±0,25 ^a	14,06±0,12 ^a	13,34±0,60 ^a	**
	N2	15,94±0,35	14,25±0,56 ¹	14,76±0,33	14,71±0,49	14,32±0,11	n.s.
	N3	15,20±0,68	14,83±0,32 ^{1,2}	14,58±0,25	14,41±0,24	14,10±0,20	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
Hue	CO	60,96±0,41 ^a	72,20±0,98 ^{b3}	75,84±2,19 ^{bc}	79,01±1,38 ^{c3}	80,56±2,17 ^{c3}	***
	ER	61,05±1,49 ^a	66,16±0,26 ^{b1}	69,65±1,94 ^b	69,01±1,22 ^{b1}	68,96±1,87 ^{b1}	*
	N1	60,47±1,13 ^a	68,32±0,59 ^{b1,2}	70,86±0,91 ^{bc}	74,24±0,60 ^{c2}	73,69±1,78 ^{c1,2}	***
	N2	61,52±1,77 ^a	69,54±0,72 ^{b2}	72,80±0,39 ^{bc}	73,93±0,88 ^{c2}	74,79±1,06 ^{c2}	***
	N3	62,25±1,26 ^a	70,17±1,10 ^{b2,3}	72,12±1,04 ^{bc}	73,90±0,83 ^{c2}	74,55±1,05 ^{c2}	***
	Sign.	n.s.	**	n.s.	**	**	
Chroma	CO	18,89±0,57 ^b	16,58±0,10 ^a	15,90±0,12 ^a	15,70±0,22 ^a	15,45±0,72 ^a	**
	ER	17,14±0,50	15,70±0,42	15,55±0,28	15,50±0,50	15,75±0,34	n.s.
	N1	18,70±0,44 ^c	15,55±0,29 ^b	15,05±0,18 ^{ab}	14,61±0,16 ^{ab}	13,90±0,53 ^a	***
	N2	18,15±0,10 ^b	15,21±0,57 ^a	15,45±0,31 ^a	15,31±0,53 ^a	14,85±0,10 ^a	**
	N3	17,17±0,59 ^b	15,77±0,31 ^a	15,33±0,27 ^a	15,00±0,20 ^a	14,63±0,22 ^a	**
	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

a,b,c,d: Valores médios na mesma linha (correspondente ao mesmo tratamento) não seguido por letras comuns diferem significativamente ($P<0,05$).

1,2,3: Valores médios na mesma coluna (correspondente ao mesmo tempo de armazenamento) não seguido por números comuns diferem significativamente ($P<0,05$).

Tratamentos: CO: controle; ER: eritorbato de sódio; N1: extrato de oregano em concentração definida pelo método Folin-Ciocalteu; N2: extrato de oregano em concentração definida pelo método DPPH⁺; N3: extrato de oregano em concentração definida pelo método FRAP.

Sign.= Significância: *** ($P<0,001$), ** ($P<0,01$), * ($P<0,05$), n.s. não significativo ($P\geq 0,05$) (n = 6).

Fonte: Própria autoria.

A análise estatística revelou diferenças significativas ($P<0,01$) entre todos os tratamentos e controles experimentais para valores de a* de 90 dias até o fim do período de armazenamento, uma vez que a estabilidade e retenção da cor vermelha

foi significativamente melhorada em relação ao controle, apresentando valores superiores em amostras de tratamentos contendo antioxidantes.

Os resultados confirmam que as amostras sofreram descoloração, devido principalmente à perda da cor vermelha, e estão de acordo com resultados relatados por Georgantelis et al. (2007) em hambúrgueres de carne bovina submetidos ao congelamento. Ao final do período de armazenamento, os valores mais baixos de a^* foram observadas no grupo CO, enquanto que os tratamentos contendo antioxidantes apresentaram os maiores valores ($P<0,01$) (Figura 15). Comparativamente, o tratamento do ER mostrou maior índice de vermelho ($P<0,01$) ao final do armazenamento, que provavelmente por ser um composto hidrossolúvel, primeiramente induziu a uma maior proteção do pigmento dos hambúrgueres, mantendo a sua cor mais estável, enquanto que o extrato antioxidante natural por apresentar uma característica mais lipossolúvel, exerceu uma maior função em relação à inibição oxidativa.

Figura 15 – Valores de a^* de hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C ($n = 6$).

Fonte: Própria autoria.

Para explicar a descoloração, segundo Viljanen et al. (2004) os radicais livres e outros produtos oriundos da oxidação protéica podem induzir à oxidação lipídica e, assim, os pigmentos heme podem ser afetados por ação pró-oxidante. Isto está

parcialmente de acordo com os resultados deste estudo, em que o teste de correlação de Pearson indicou que o teor de carbonilas foi negativamente relacionado com valores de a^* ($r = -0,34$, $P < 0,01$) e positivamente correlacionado com hue ($r = 0,37$, $P < 0,01$). De acordo com Estévez e Cava (2004), a degradação oxidativa resultando em globinas desnaturadas e a clivagem oxidativa do pigmento hematina, poderiam conduzir à liberação de ferro a partir da molécula heme, promovendo a descoloração eventual dos hambúrgueres. Assim, a incorporação do antioxidante natural resultou em valores superiores de a^* e de certa forma melhorou significativamente ($P < 0,01$) a estabilidade de cor em hambúrgueres de cordeiro se comparado com o tratamento controle.

O comportamento atribuído ao acúmulo gradual de metamioglobina superficial e consequente descoloração das amostras (GEORGANTELIS et al., 2007) depende da presença de sistemas redutores e da reação de oxidação lipídica (ESTÉVEZ, MORCUENDE e CAVA, 2003; FAUSTMAN et al., 2010).

Além destes resultados, a razão entre as reflectâncias de 630/580 nm foi utilizada como uma estimativa indireta de formação de metamioglobina superficial em relação à oximioglobina. Esta relação é um indicativo da oxidação superficial da mioglobina ao longo do tempo de armazenamento, sendo que o comprimento de onda de 580 nm indica o pico de absorção para a oximioglobina e o de 630 nm para a metamioglobina. Portanto, quanto menor é a razão entre os valores das reflectâncias, ou seja, mais próximas de “1”, maior é a conversão de mioglobina em metamioglobina, promovendo descoloração ao longo do período de armazenamento (PEARCE et al., 2005; TOOHEY et al., 2008).

Ao longo da estocagem, observou-se valores decrescentes para estimativa indireta de metamioglobina (Figura 16), que indicaram uma significativa formação para todos os tratamentos ($P < 0,001$). Inicialmente ER apresentou uma maior razão ($1,86 \pm 0,08$) ($P < 0,05$), que se manteve até 120 dias apresentando valor superior ($1,34 \pm 0,04$) ($P < 0,001$), mais distantes de “1”, em comparação às outras, devido à baixa formação de metamioglobina, confirmando resultados de a^* anteriormente descritos.

Figura 16 – Estimativa indireta de formação de metamioglobina superficial em hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C ($n = 6$).

Fonte: Própria autoria.

Estudos comprovam que a descoloração pode ser acelerada pela ocorrência da oxidação lipídica em produtos cárneos (FAUSTMAN et al., 2010; KIM, CHO e HAN, 2013). Neste caso, ao final do armazenamento, o CO apresentou maiores valores de TBARS em comparação ao ER e ao extrato natural em diferentes níveis ($P < 0,001$), e quanto à metamioglobina, o ER apresentou menor descoloração ($P < 0,001$), como comprovado também por valores de a^* . Porém, CO apresentou maior formação de metamioglobina ($P < 0,001$), não diferindo, dos tratamentos contendo antioxidante natural ($P > 0,05$), pela mesma justificativa descrita para resultados de a^* . Entretanto, este efeito provavelmente também pode estar atribuído à interferência da própria cor do extrato e à oxidação da clorofila, que pode promover a redução da cor vermelha, segundo verificado por Akarpat, Turhan e Ustun (2007), em hambúrgueres com extratos aquosos de urtiga armazenados por 120 dias a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Comparando-se o antioxidante sintético ao natural em maior concentração aos 120 dias, o ER apresentou valor superior de malonaldeído e menor índice de peróxidos em comparação ao extrato em maior concentração (N3) ($P < 0,001$), e quanto à metamioglobina, este também se manteve com valor significativamente mais alto indicando menor descoloração das amostras ($P < 0,001$).

3.6.2 Oxidação lipídica

O processo oxidativo dos hambúrgueres não foi impedido durante o período de estocagem, devido a presença de radicais livres que se mantêm mais estáveis em temperaturas baixas (PENNISI FORELL et al., 2010). A progressão da oxidação lipídica durante o armazenamento dos hambúrgueres de cordeiro, foi avaliado por 2 marcadores, TBARS e índice de peróxidos (IP).

Conforme pode ser visualizado na Figura 17, a adição de antioxidantes e o tempo de armazenamento teve efeitos significativos nos valores de TBARS ($P < 0,05$). Durante a estocagem, observou-se a tendência de aumento da concentração de malonaldeído, exceto para o tratamento ER em que foi observado um decréscimo entre 90 e 120 dias ($P < 0,01$). Esta redução no teor de malonaldeído após um aumento pode ocorrer quando a taxa de reação das carbonilas com proteínas se torna maior do que a taxa de formação de TBARS (RACANICCI et al., 2004), provavelmente quando há a ligação cruzada das substâncias reativas ao TBA com proteínas, sendo os TBARS formados e perdidos por reações posteriores (OZEN et al., 2011).

Figura 17 – Índice de TBARS de hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C ($n = 6$).

Fonte: Própria autoria.

Segundo Ozer e Sariçoban (2010), valores de TBARS até 1,59 mg de MDA/kg de amostra não causam problemas para a saúde do consumidor. Considerando este limite, apenas a maior concentração de extrato de orégano avaliada, ou seja, a concentração determinada por meio do método FRAP de avaliação da capacidade antioxidante, foi realmente capaz de manter a oxidação lipídica em níveis aceitáveis no hambúrguer de cordeiro durante 120 dias de armazenamento congelado.

O índice de peróxidos foi quantificado na fração de lipídeos após extração e correspondem à concentração de peróxidos de lipídeos, normalmente considerados como produtos primários da oxidação lipídica. Observou-se um aumento significativo ao longo do tempo para todos os tratamentos ($P < 0,001$), exceto para o ER, que apresentou diminuição significativa até 60 dias e depois um ligeiro aumento ($P < 0,05$) (Figura 18). Isso ocorreu devido à instabilidade dos hidroperóxidos, já que o aumento é justificável por elevada formação em relação a decomposição deste, e, no caso do ER, devido à decomposição mais rápida à medida que se formam (AKARPAT, TURHAN e USTUN, 2007).

Considerando-se os valores obtidos para TBARS aos 120 dias, os resultados de peróxidos foram mais altos para o tratamento CO ($1,09 \pm 0,04$) em relação ao ER ($0,14 \pm 0,01$) ($P < 0,001$), como esperado. Desta maneira, assim que estes maiores teores de peróxidos iam sendo formados no CO, já iam sendo transformados em malonaldeído, apresentando também maiores valores para TBARS ($P < 0,001$). Porém, para os tratamentos contendo antioxidante natural essa conversão foi mais lenta, já que mesmo apresentando valores superiores aos de ER ($P < 0,001$) para peróxidos, a formação de TBARS foi menor ($P < 0,001$). Entretanto, de acordo com Ozogul e Uçar (2013), o nível de peróxidos permaneceu abaixo do valor máximo recomendado para consumo humano (20 mEq/kg de lipídeos).

Figura 18 – Índice de peróxidos de hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C ($n = 6$).

Fonte: Própria autoria.

Contrariamente ao IP, ao final do período de estocagem, valores mais baixos de TBARS foram observados nos tratamentos N2 e N3 ($1,92 \pm 0,17$ e $1,12 \pm 0,05$ mg de MDA/kg, respectivamente), enquanto que maior taxa de oxidação ($5,85 \pm 0,34$ mg MDA/kg) ocorreu em CO ($P < 0,001$). Desta forma, a eficácia antioxidante de ER foi menor ($2,37 \pm 0,54$ mg MDA/kg) do que as concentrações usadas em N2 e N3 ($P < 0,001$), não diferindo significativamente de N1 ($2,51 \pm 0,06$ mg MDA/kg). Assim, N2 e N3 apresentaram os maiores efeitos antioxidantes demonstrando respectivamente cerca de 67 e 80% de redução nos valores de TBARS em relação ao CO. Este comportamento está de acordo com os relatados por Sánchez-Escalante et al. (2003), que encontraram valores de TBARS significativamente mais baixos ($P < 0,05$) em hambúrgueres bovinos contendo extratos de orégano em comparação ao tratamento controle. Akarpat, Turhan e Ustun (2008) e Lorenzo et al. (2014), também relataram menores valores de TBARS ($P < 0,05$) em hambúrgueres contendo extratos naturais em comparação a tratamentos controle, assim como Ozen et al. (2011), que confirmaram a efetividade de extratos oriundos de fontes naturais para retardar oxidação lipídica em músculo de peixe picado durante estocagem congelada, em comparação àquelas sem adição de antioxidantes.

No entanto, apesar da análise de TBARS quantificar os produtos secundários formados pela decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados (MARGARITES et al., 2011; OSAWA, FELÍCIO e GONÇALVES, 2005), o tratamento ER apresentou maior valor de malonaldeído em relação ao N3, e inversamente, o índice de peróxidos apresentou-se bem menor em comparação ao mesmo tratamento.

Uma possível explicação seria que o hambúrguer contendo orégano, além de ser natural, apresentou índice de peróxidos maior porque o extrato foi capaz de impedir a formação de compostos secundários, e, conseqüentemente permitindo menor conversão a malonaldeído (TBARS), similarmente aos resultados encontrados por Ozen et al. (2011), em estudos com músculo de peixe picado armazenado a -18°C por 3 meses. Contrariamente, o ER não teria sido capaz de parar a reação de oxidação lipídica, ou seja, os peróxidos teriam sido rapidamente transformados em compostos secundários desde o princípio do armazenamento ($P < 0,05$) e, portanto, este índice permaneceu mais baixo aos 120 dias em relação aos outros, permitindo um maior valor do TBARS (LEE et al., 2011; MERCADANTE et al., 2010; OZEN et al., 2011; TRINDADE, MANCINI-FILHO e VILLAVIVENCIO, 2010).

Trindade, Mancini-Filho e Villavivencio (2010), comprovaram este mesmo comportamento ao trabalharem com hambúrguer bovino irradiado estocado a -20°C por 90 dias. Neste caso, os valores de peróxidos permaneceram baixos em amostras controle e com extrato de orégano, devido à decomposição dos hidroperóxidos a uma taxa mais elevada do que de sua formação, contribuindo para o aumento dos TBARS. Contrariamente, Uçak, Ozogul e Durmus (2011) em estudos com hambúrgueres de cavala a 4°C, obtiveram maiores valores de IP no tratamento controle (3,79 a 4,19 mEq/kg de lipídeos) em comparação ao extrato de alecrim, que apresentou-se mais eficiente ao longo de 15 dias (1,27 a 2,19 e mEq/kg de lipídeos).

A correlação de Pearson indicou que os valores de pH foram positivamente relacionados com peróxidos ($r = 0,29$, $P < 0,05$). Assim, considerando-se os resultados de pH, como o ER apresentou valores mais elevados em relação ao N3 ($P < 0,05$), indicando maior teor de radical hidroxil ($\text{OH}^{\bullet}$) disponível para a iniciação da oxidação lipídica, conseqüentemente estes radicais vão atuar removendo átomos de hidrogênio dos substratos, principalmente de AGI, para a formação de produtos de oxidação primária, os hidroperóxidos. Estes, em presença de metais na forma de

íons ou associados as proteínas (hemoglobinas) se degradam e o íon ferroso ou heme é liberado devido à oxidação do pigmento hematina (oximioglobina) em férrico (metamioglobina), e esta forma, mais solúvel, promoverá a rápida formação de compostos secundários, aldeídos e cetonas, sobretudo malonaldeído (ESTÉVEZ e CAVA, 2004; HUDSON E COMSTOCK, 2001; KIM, CHO e HAN, 2013; LIMA, 2012; MERCADANTE et al., 2010; MIN, CHEN e GREEN, 2009).

3.6.3 Oxidação protéica

Além da oxidação lipídica, o grau de oxidação de proteínas, considerada também uma das principais causas de deterioração da qualidade de carne e seus derivados (ESTÉVEZ et al., 2008; LUND et al., 2011), foi avaliada neste estudo a partir da formação de carbonilas e perdas de grupos tióis.

Conforme apresentado na Figura 19, observou-se uma gradual tendência no aumento de carbonilas em todos os hambúrgueres de cordeiro, sendo que as concentrações de extrato de orégano adicionadas nos produtos dos tratamentos N2 e N3 foram eficazes na inibição da formação de carbonilas durante todo o período de estocagem, não apresentando variação significativa de 0 a 120 dias ($P>0,05$).

Aos 120 dias, pode-se também observar que menores valores para carbonilas foram obtidos em tratamentos contendo o extrato natural, respectivamente $2,05\pm0,07$, $2,04\pm0,03$ e $1,82\pm0,08$ nmol/mg de proteína para N1, N2 e N3, em comparação ao CO ($2,90\pm0,34$ nmol/mg) e ER ($2,70\pm0,02$ nmol/mg) ($P<0,01$), que não diferiram entre si ($P>0,05$).

Figura 19 – Formação de carbonilas de hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C ($n = 6$).

Fonte: Própria autoria.

Com relação aos tióis livres, até 60 dias não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$), assim como para carbonilas, sendo que comparando-se as duas análises, mesmo comportamento foi observado para N2 e N3 ao longo do período de estocagem, mantendo estabilidade quanto à perda de grupos tióis ($P > 0,05$). No entanto, aos 120 dias de armazenamento estes mesmos tratamentos diferiram significativamente em relação aos outros ($P < 0,01$), apresentando maiores valores de grupos tióis livres, respectivamente de $49,13 \pm 1,39$ e $47,98 \pm 2,35$ nmol/mg de proteína, comprovando a ocorrência de um baixo stress oxidativo das referidas amostras (Figura 20).

Figura 20 – Análise de tióis de hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C ($n = 6$).

Fonte: Própria autoria.

Estes resultados estão de acordo com estudos de outros autores (JIA et al., 2012; JONGBERG et al., 2011) que relataram que a adição de antioxidantes naturais promoveu efeitos inibitórios sob a oxidação de proteínas. No entanto, Lund et al. (2007) observaram que o extrato de alecrim não inibiu a oxidação protéica em hambúrgueres bovinos. Este tipo de comportamento pode ser justificado pela diferente estrutura química de compostos fenólicos, bem como a natureza e conformação das proteínas (ESTÉVEZ et al., 2008).

No presente estudo, o extrato de orégano foi eficaz na inibição da formação de compostos carbonílicos de proteínas, apesar de um efeito inibitório menos intenso do que para a oxidação lipídica. Estes resultados podem ser atribuídos à rápida ocorrência da oxidação lipídica em relação à protéica, pela provável ocorrência de ligação covalente entre compostos fenólicos e proteínas que podem ter mascarado a atividade antioxidante destes (ARTS et al., 2002; ESTÉVEZ et al., 2008; LUND et al., 2007).

3.6.4 pH

Ao longo do período não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P>0,05$), porém notou-se que as amostras diferiram entre si aos 0 ($P<0,05$), 30 ($P<0,001$) e 120 dias ($P<0,05$), permanecendo com valores aceitáveis, entre 5,8 e 6,2 (BRASIL, 1989).

Os tratamentos contendo extrato natural (N2 e N3) apresentaram valores inferiores aos 120 dias ($P<0,05$). O tratamento N1, apesar de possuir uma tendência de valor dependente da concentração de extrato adicionado, não apresentou diferenças significativas ($P>0,05$) em relação ao CO e ER (Tabela 8).

Tabela 8 – Valores de pH de hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C (média±erro padrão).

Tratamentos	Dias de armazenamento					Sign.
	0	30	60	90	120	
CO	5,99±0,03 ²	6,09±0,02 ³	6,04±0,01	6,08±0,05	6,05±0,02 ²	n.s.
ER	5,99±0,02 ²	6,05±0,005 ³	6,01±0,04	6,07±0,004	6,05±0,03 ²	n.s.
N1	5,92±0,02 ¹	5,97±0,02 ²	5,94±0,05	6,00±0,04	6,00±0,01 ^{1,2}	n.s.
N2	5,91±0,01 ¹	5,92±0,02 ¹	5,91±0,04	5,98±0,03	5,98±0,01 ¹	n.s.
N3	5,89±0,02 ¹	5,89±0,002 ¹	5,90±0,05	5,96±0,03	5,96±0,01 ¹	n.s.
Sign.	*	***	n.s.	n.s.	*	

Tratamentos: BR = Branco, CO = Controle com eritorbato de sódio, N1 = Nível de extrato de orégano baseado em equivalência por método de Folin-Ciocalteu, N2 = Nível de extrato de orégano baseado em equivalência por método de DPPH, N3 = Nível de extrato de orégano baseado em equivalência por método de FRAP.

^{1,2,3}: Valores médios em mesma coluna (correspondente ao mesmo tempo de armazenamento) não seguidos de mesmos números diferem significativamente ($P<0,05$).

Sign.= Significância: *** ($P<0,001$), ** ($P<0,01$), * ($P<0,05$), n.s. não significativo ($P\geq 0,05$) ($n = 6$).

Fonte: Própria autoria.

Estes resultados estão de acordo com o que foi observado por Lorenzo et al. (2014) que obtiveram valores de pH mais baixos em hambúrgueres contendo extrato de chá, algas e uva. Este comportamento pode ser explicado devido à presença de compostos ativos, como por exemplo, ácidos orgânicos nos extratos, que provavelmente promovem uma queda do pH nos produtos cárneos (ALESON-CARBONELL et al., 2005).

3.6.5 Perdas de água por cocção, redução de diâmetro e perfil de textura

De acordo com resultados obtidos, a partir da realização de análise estatística, não existiram diferenças significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos durante o período estudado, com relação aos parâmetros de perfil de textura (TPA), perdas de água por cocção (PAC), que em geral apresentaram $28,79\pm1,09$ a $23,35\pm2,57\%$, e redução de diâmetro (RD) médias entre $24,41\pm0,91$ e $24,22\pm0,55\%$, respectivamente aos zero e 120 dias.

Similarmente ao PAC, Hayes et al. (2010) também não detectaram diferenças significativas ($P>0,05$) em hambúrgueres bovinos nos quais foram adicionados diferentes antioxidantes naturais, apresentando valores médios que oscilaram entre 30,27 e 36,59%, apesar da existência de variação detectada quanto à capacidade de retenção de água (41,85 a 55,04%) entre os tratamentos de acordo com a concentração dos ingredientes funcionais.

3.6.6 Avaliação da manutenção antioxidante do extrato de orégano no hambúrguer de cordeiro

Os tratamentos contendo extratos apresentaram valores superiores quanto ao poder redutor devido ao alto teor de compostos antioxidantes presentes, já que quanto maior a concentração destes, maior é a eliminação de radicais livres que promove a estabilização e bloqueio da reação em cadeia (BARROS, BAPTISTA e FERREIRA, 2007).

A presença de redutores (antioxidantes) na amostra promoveu a redução do complexo de cianeto férrico (Fe^{3+}) à forma ferrosa (Fe^{2+}), sendo esta reação comprovada pela alteração da cor com formação de coloração de Azul de Prússia Perl a 700 nm, conforme descrito por Chung et al. (2002).

Observou-se que o poder redutor, baseado na curva padrão de BHA, aumentou de acordo com a presença de compostos antioxidantes, ou seja, quanto maior foi a intensidade de cor, mais alta era a absorbância indicando maior

capacidade antioxidante de acordo com a amostra. Conforme pode ser visualizado na Figura 21, estatisticamente, houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$), porém apresentaram mesmo comportamento no tempo zero e aos 120 dias ($P > 0,05$). CO e ER apresentaram menor potencial de redução em comparação aos hambúrgueres contendo extrato de orégano, sendo que quanto ao ER, tanto no tempo zero ($0,87 \pm 0,01$) quanto aos 120 dias ($0,99 \pm 0,04$) de armazenamento, diferiu do tratamento N1, que também apresentou menores valores ($1,74 \pm 0,02$ e $1,76 \pm 0,06$) em comparação aos tratamentos N2 e N3, que não diferiram entre si com médias de $2,23 \pm 0,11$ e $2,20 \pm 0,26$; e $2,46 \pm 0,10$ e $2,46 \pm 0,04$ mg BHA/g de amostra, respectivamente nos diferentes tempos.

Figura 21 – Poder redutor realizado em amostras de hambúrguer de cordeiro aos 0 e 120 dias ($n = 6$).

Fonte: Própria autoria.

A eliminação dos radicais livres não foi afetada ao longo do tempo em todos os tratamentos, incluindo o CO, provavelmente porque neste caso a oxidação induziu à formação de compostos com ação redutora, conforme também justificado por Huang et al. (2011) em seus estudos. Neste caso, verificaram a atividade antioxidante de carne bovina e suína adicionadas de extratos de lótus em comparação a amostras sem adição de antioxidantes, cujas absorbâncias obtidas em testes de poder redutor mantiveram-se constantes durante o período avaliado.

Além da produção de compostos redutores, tem sido demonstrada que proteínas e peptídeos que compõem carnes, como por exemplo, a carnosina, apresentam ação antioxidante devido à capacidade de sequestrar radicais livres e quelar metais (SERPEN, GOKMEN e FOGLIANO, 2012).

Com estes resultados pode-se inferir sobre a manutenção da funcionalidade do antioxidante adicionado, não do ponto de vista do poder de conservação do produto cárneo somente, mas também da ingestão de um produto contendo um ingrediente com maior função adjuvante na manutenção da saúde humana, em comparação ao composto sintético comumente utilizado na indústria.

3.7 Estabilidade microbiológica

Nos tempos zero e aos 120 dias, não foram detectadas contagens de microrganismos estafilococos coagulase positiva (<10 UFC/g de amostra), clostrídios sulfito redutores (<10 UFC/g de amostra) e as amostras foram isentas de contaminação por *Salmonella*. Com relação aos coliformes termotolerantes, somente foram encontradas contagens esporádicas de $1,00 \times 10^1$ e $3,75 \times 10^1$ no tempo zero e de $3,00 \times 10^1$ e $1,00 \times 10^1$ UFC/g de amostra aos 120 dias para os tratamentos CO e ER, respectivamente, sendo que para o tratamento N1 também foi encontrada contagem de $1,25 \times 10^1$ UFC/g de amostra ao final da estocagem, refletindo provável contaminação durante manipulação da matéria prima e/ou amostras. Entretanto, estes resultados obtidos indicaram boa qualidade microbiológica dos cortes cárneos de cordeiro utilizados.

Todas as amostras mantiveram-se durante 120 dias segundo os critérios estabelecidos pela legislação brasileira através da Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), cujo padrão microbiológico para produtos cárneos congelados crus estabelece uma contagem máxima de 10^3 UFC/g para coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella* em 25 g de amostra.

Apesar de não ter sido detectada variação significativa ($P > 0,05$) com relação ao desenvolvimento de psicrotróficos aeróbios, pode-se observar uma tendência de redução microbiana ao final do armazenamento, provavelmente devido aos efeitos do processo de congelamento, tais como a formação de cristais de gelo na célula,

redução da atividade de água e consequentemente perda da solubilidade de proteínas (FERNANDES et al., 2013), permanecendo os produtos cárneos com contagens entre 10^3 e 10^4 UFC/g amostra (Figura 22). Assim, devido à cessação da atividade bacteriana, similarmente como constatado no presente estudo, Ozogul e Uçar (2013), também observaram a redução de microrganismos deteriorantes em hambúrgueres de peixe ao longo do tempo (-18°C), cujas contagens reduziram de 5,0 (tempo zero) a 3,70 log UFC/g (9 meses). Apesar disto, constataram que, diferentemente do presente estudo, o uso de extratos naturais, principalmente o de orégano, promoveram maior efeito antimicrobiano em comparação ao controle.

Figura 22 – Desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos aeróbios em hambúrgueres de cordeiro durante armazenamento a -18°C ($n = 6$).

Fonte: Própria autoria.

Considerando-se que o início da deterioração ocorre a partir de contagens de 10^6 UFC/g (LEITÃO, 2003), bem como limite máximo de 10^7 UFC/g (ICMSF; 1986; NTZIMANI, GIATRAKOU e SAVVAIDIS, 2010), os hambúrgueres armazenados em condições normais de comercialização (-18°C) não apresentaram sinais de deterioração, e consequentemente nenhum risco à saúde do consumidor, até 120 dias independente do tratamento, já que não ultrapassaram 10^5 UFC/g de amostra.

3.8 Estabilidade sensorial

Os resultados quanto aos atributos sensoriais avaliados aos 120 dias de estocagem para os tratamentos podem ser visualizados na Figura 23. Observou-se que em geral, os tratamentos contendo antioxidantes mantiveram uma boa aceitação durante os 120 dias de estocagem para todos os atributos avaliados, permanecendo com valores médios próximos a 7 (“gostei moderadamente”).

As amostras sem antioxidante apresentaram notas acima de 5 (“nem gostei/nem desgostei”) até 90 dias de estocagem para todos os atributos. No entanto, após 120 dias este tratamento não foi aceitável pelos provadores com relação ao atributo sabor, apresentando uma média de $4,82 \pm 0,91$. Além disto, ao final da estocagem houve diferença significativa no aroma ($5,08 \pm 0,88$) e qualidade global ($5,27 \pm 0,88$) ($P < 0,001$), além de variação quanto à textura ($5,83 \pm 1,02$) ($P < 0,01$) com relação aos outros tratamentos.

Também houve uma maior aceitação da qualidade global ($P < 0,001$) para amostras com antioxidantes quando comparadas ao tratamento controle, não havendo, no entanto, diferenças ($P > 0,05$) na aceitação sensorial entre os hambúrgueres produzidos com o antioxidante sintético e aqueles produzidos com as três diferentes concentrações do extrato de orégano. Estes resultados são contrários aos estudos de Lee et al. (2005) que não encontraram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre hambúrgueres sem antioxidante, com BHA e extrato de alecrim.

De uma maneira geral, o antioxidante natural extrato de orégano, nas três concentrações avaliadas, foi tão eficiente quanto o eritorbato de sódio na preservação da qualidade sensorial dos hambúrgueres, o que pode favorecer a substituição do antioxidante sintético pelo natural, permitindo a obtenção de um produto cárneo saudável e com rótulo mais limpo (*Clean Label*), sem adição de conservantes sintéticos, conforme desejado pelos consumidores atualmente.

Figura 23 – Avaliação sensorial de hambúrgueres de cordeiro após 120 dias de armazenamento a -18°C (n = 60).

Fonte: Própria autoria.

De acordo com Soldatou et al. (2009), o ranço pode ser detectado em carne de cordeiro somente quando atinge valores de TBARS superiores a 4,40 mg MDA/kg, podendo variar em função da sensibilidade dos provadores selecionados. Assumindo este valor como referência para a detecção da rancidez oxidativa, poderia supor-se que a concentração de TBARS no tratamento controle atingiu níveis de detecção a partir de 90 dias de armazenamento, enquanto que tratamentos com antioxidantes não excederam este valor limite durante todo o armazenamento.

Vale lembrar que este valor de 4,40 para detecção sensorial é superior ao limite de 1,59 mg MDA/kg citado como limite para evitar problemas à saúde do consumidor. Devido a isto, o uso de antioxidantes em produtos à base de carne de cordeiro é de extrema importância para impedir problemas de saúde aos consumidores, que podem ingerir produtos oxidados sem perceber.

4 CONCLUSÃO

O extrato de orégano pode ser considerado uma importante fonte antioxidante e uma alternativa natural viável para substituição do antioxidante sintético eritorbato de sódio em hambúrguer de cordeiro, favorecendo a estabilidade da maioria dos parâmetros físico-químicos avaliados, reduzindo a oxidação tanto lipídica quanto

protéica e mantendo os produtos com boa aceitação sensorial durante 120 dias de armazenamento congelado.

Em relação às diferentes concentrações de extrato de orégano avaliadas, calculadas em função dos resultados obtidos por três diferentes métodos de avaliação da capacidade antioxidante, é possível afirmar que o método FRAP foi o mais eficiente em estimar a quantidade adequada de antioxidante natural a ser adicionada, sendo a única que manteve os níveis de oxidação lipídica dos hambúrgueres dentro de limites aceitáveis para a saúde humana.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFOLABI, C.A.; EFERE, M.O.; EBENEZER, O.F. Evaluation of antioxidant and free radical scavenging capacities of some nigerian indigenous medicinal plants. **Journal of Medicinal Food**, v.13, n.2, p.444-451, 2010.

AKARPAT, A.; TURHAN, S.; USTUN, N.S. Effects of hot-water extracts from myrtle, rosemary, nettle and lemon balm leaves on lipid oxidation and color of beef patties during frozen storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.32, p.117-132, 2008.

ALESON-CARBONELL, L. et al. Characteristics of beef burger as influenced by various types of lemon albedo. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.6, p.247-255, 2005.

ARANHA, C.P.M.; JORGE, N. Antioxidant potential of oregano extract (*Origanum vulgare* L.). **British Food Journal**, v.114, p.6-7, 2012.

ARTS, M.J.T.J. et al. Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.1184-1187, 2002.

BAGCHI, D. et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. **Toxicology**, v.148, n.2, p.187-197, 2000.

BARROS, L.; BAPTISTA, P.; FERREIRA, I.C.F.R. Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.1731-1737, 2007.

BERRY, B.W. Low fat level effects on sensory, shear, cooking, and chemical properties os ground beef patties. **Journal of Food Science**, v.57, n.3, p.537-540, 1992.

BRASIL. Portaria SVS/MS n.º 104, de 14 de maio de 1999. Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/Aromas. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 17 maio 1999. Seção I.

BRASIL. Instrução Normativa n.º 20, de 31 de julho de 2000. Dispõe sobre os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de hambúrguer. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília-DF, jul. 2000.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução RDC nº 12, 02 de jan. 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial**. Brasília, 10 jan. 2001, Seção 1, p.45-47.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Métodos Analíticos para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes – LANARA. Brasília, 1989.

CHUNG, Y.C. et al. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NKI. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2454–2458, 2002.

COLINDRES, P.; BREWER, M.S. Oxidative stability of cooked, frozen, reheated beef patties: effect of antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, n.5, p.963-968, 2011.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.82, p.70-77, 1959.

ESTÉVEZ, M.; MORCUENDE, D.; CAVA, R. Oxidative and colour changes inmeat from three lines of free-range reared Iberian pigs slaughtered at 90 kg live weight and from industrial pig during refrigerated storage. **Meat Science**, v.65, p.1139-1146, 2003.

ESTÉVEZ, M. et al. Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. **Meat Science**, v.80, p.1290-1296, 2008.

ESTÉVEZ, M.; CAVA, R. Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of live pâté. **Meat Science**, v.68, p.551-558, 2004.

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

FERNANDES, R.P.P. et al. Evaluation of physicochemical, microbiological and sensory stability of frozen stored vacuum-packed lamb meat. **Journal of Integrative Agriculture**, v.12, n.11, p.1946-1952, 2013.

FERNANDES, R.P.P. et al. Stability of lamb loin stored under refrigeration and packed in different modified atmosphere packaging systems. **Meat Science**, v.96, p.554-561, 2014.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.

GARCÍA, M.L.; CALVO, M.M.; SELGAS, M.D. Beef hamburgers enriched in lycopene using dry tomato peel as an ingredient. **Meat Science**, v.83, p.45-49, 2009.

GAWLIK-DZIKI, U. Dietary spices as a natural effectors of lipoxygenase, xanthine oxidase, peroxidase and antioxidant agents. **LWT - Food Science and Technology**, v.47, p.138-146, 2012.

GEORGANTELIS, D. et al. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. **Meat Science**, v.75, n.2, p. 256-264, 2007.

HAYES, J.E. et al. Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties. **Meat Science**, v.84, p.613-620, 2010.

HORWITZ, W.; LATIMER, G.W. **Association of Official Analytical Chemistry—AOAC Official Methods of Analysis** (18th ed.). Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists-AOAC International, 2007.

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

HUDSON, J.Q.; COMSTOCK, T.J. Considerations for optimal iron use for anemia due to chronic kidney disease. **Clinical Therapeutics**, v.23, n.10, p.1637-1671, 2001.

HUNT, M.C. et al. Guidelines for meat color evaluation. American Meat Science Association, Kansas State University: Manhattan, KS, 1991. p.1-17.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specification for Foods – **Microorganisms in foods - Sampling for microbiological analysis**: principles and specific applications. Toronto: University of Toronto Press, 1986. 193p.

JIA, N. et al. Antioxidant activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on lipid and protein oxidation of pork patties during chilled storage. **Meat Science**, v.91, n.4, p.533-539, 2012.

JONGBERG, S. et al. Effect of white grape extract and modified atmosphere packaging on lipid and protein oxidation in chill stored beef patties. **Food Chemistry**, v.128, p.276-283, 2011.

JUNG, S. et al. Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.80, n.2, p.1169-1173, 2003.

JUNG, E.; JOO, N. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) and soybean oil effects on quality characteristics of pork patties studied by response surface methodology. **Meat Science**, v.94, p.391-401, 2013.

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

KING-BRINK, M.; SEBRANEK, J.G. Combustion method for determination of crude protein in meat and meat products: Collaborative study, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists' International**, Arlington, v.76, p.787-793, 1993.

KUSHIDA, M.M. **Validação de métodos laboratoriais: avaliação do sistema bax de análise de *Salmonella sp* em alimentos por reação de polimerase em cadeia**

(PCR). 2005. 194p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2005.

LEE, M.A. et al. Effects of kimchi ethanolic extracts on oxidative stability of refrigerated cooked pork. **Meat Science**, v.89, p.405-411, 2011.

LEE, S. et al. The effects of antioxidant combinations on color and lipid oxidation in n-3 oil fortified ground beef patties. **Meat Science**, v.70, p.683-689, 2005.

LEITÃO, M.F.F. Aspectos microbiológicos da carne. In: CASTILLO, C.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K. M. V. A. B.; MIYAGUSKU, L. **Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados**. São Paulo: Varela, 2003. 191p.

LEVINE, R.L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v.186, p.464-478, 1990.

LIU, G.; XIONG, Y.L. Electrophoretic pattern, thermal denaturation, and in vitro digestibility of oxidized myosin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.624-630, 2000.

LIMA, M.C.O. **Análise de carne caprina armazenada sob congelamento**. 2012. 66p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Bahia, 2012.

LIGOR, M.; BUSZEWSKI, B. The comparison of solid phase microextraction-GC and static headspace-GC for determination of solvent residues in vegetable oils. **Journal of Separation Science**, v.31, p.364-371, 2008.

LORENZO, J.M. et al. Influence of natural extracts on shelf life of modified atmosphere-package pork patties. **Meat Science**, v.96, p.526-534, 2014.

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

LUND, M.N. et al. High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage. **Meat Science**, v.77, p.295-303, 2007.

LUKAS, B.; NOVAK, J. The complete chloroplast genome of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*). **Gene**, v.528, n.2, p.163-169, 2013.

MARGARITES, A.C.F. et al. Ficocianina, tocoferol e ácido ascórbico na prevenção da oxidação lipídica em charque. **Brazilian of Journal and Food Technology**, Campinas, v.14, n.4, p.301-307, 2011.

MERCADANTE, A.Z. et al. Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. **Meat Science**, v.84, p.718-726, 2010.

MERCIER, Y.; GATELLIER, P.; RENERRE, M. Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows nished on pasture or mixed diet. **Meat Science**, v.66, p.467-473, 2004.

MIN, B.; CHEN, M.-H.; GREEN, B.W. Antioxidant Activities of Purple Rice Bran Extract and Its Effect on the Quality of Low-NaCl, Phosphate-Free Patties Made from Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Belly Flap Meat. **Journal of Food Science**, v.74, p.C268-C277, 2009.

NAVEENA, B.M. et al. Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. **Meat Science**, v.80, p.304-308, 2008.

NUNEZ DE GONZALEZ, M.T. et al. Antioxidant properties of dried plum ingredients in raw and precooked pork sausage. **Journal of Food Science**, v.73, p.H63-H71, 2008.

NTZIMANI, A.G.; GIATRAKOU, V.I.; SAVVAIDIS, I.N. Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4°C: microbiological and sensory evaluation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.11, p.187-196, 2010.

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**, v.28, p.655-663, 2005.

OZEN, B.O. et al. Effect of plant extracts on lipid oxidation during frozen storage of minced fish muscle. **International Journal of Food Science and Technology**, v.46, p.724-731, 2011.

OZER, O.; SARIÇOBAN, C. The Effects of Butylated Hydroxyanisole, Ascorbic Acid, and α -Tocopherol on some Quality Characteristics of Mechanically Deboned Chicken Patty during Freezer Storage. **Czech Journal of Food Sciences**, v.28, p.150-160, 2010.

OZOGUL, Y.; UÇAR, Y. The effects of natural extracts on the quality changes of frozen chub mackerel (*Scomber japonicus*) burgers. **Food and Bioprocess Technology**, v.6, p.1550-1560, 2013.

PENNISI FORELL, S.C. et al. Effect of type of emulsifiers and antioxidants on oxidative stability, colour and fatty acid profile of low-fat beef burgers enriched with unsaturated fatty acids and phytosterols. **Meat Science**, v.86, n.2, p.364-370, 2010.

PEARCE, K. L. et al. Plasma and tissue α -tocopherol concentrations and meat colour stability in sheep grazing saltbush (*Atriplex* spp.). **Australian Journal of Agricultural Research**, v.56, p.663-672, 2005.

RACANICCI, A.M.C. et al. Antioxidant effect of dittany (*Origanum dictamnus*) in pre-cooked chicken meat balls during chill-storage in comparison rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **European Food Research and Technology**, v.218, p.521-524, 2004.

RIPOLL, G. et al. Instrumental meat quality of veal calves reared under three management systems and color evolution of meat stored in three packaging systems. **Meat Science**, Barking, v.93, n.2, p.336-343, 2013.

SÁNCHEZ-ESCALANTE, A. et al. Combined effect of modified atmosphere packaging and addition of lycopene rich tomato pulp, oregano and ascorbic acid and their mixtures on the stability of beef patties. **Food Science and Technology International**, v.9, p.77-84, 2003.

SHANTHA, N. S.; DECKER, E. A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of lipids. **Journal of AOAC International**, v.77, p.421-424, 1994.

SÁNCHEZ-ESCALANTE, A. et al. Antioxidant action of borage, rosemary, oregano and ascorbic acid in beef patties packaged in modified atmosphere. **Journal of Food Science**, v.68, p.339-344, 2003.

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

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. Ed. São Paulo: Varela, 2010, 614p.

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

SRINIVASAN, S.; HULTIN, H.O. Chemical, Physical, and Functional Properties of Cod Proteins Modified by a Nonenzymic Free-Radical-Generating System. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.310-320, 1997.

SOLDATOU, N. et al. Physicochemical and microbiological changes of “Souvlaki” – A Greek delicacy lamb meat product: Evaluation of shelf-life using microbial, colour and lipid oxidation parameters. **Food Chemistry**, v.113, p.36-42, 2009.

TOOHEY, E.S. et al. The impact of new generation pre-dressing medium-voltage electrical stimulation on tenderness and colour stability in lamb meat. **Meat Science**, v.79, p.683-691, 2008.

TRINDADE, R.A.; MANCINI-FILHO, J.; VILLAVIVENCIO, A.L.C.H. Effects of natural antioxidants on the lipid profile of electron beam-irradiated beef burgers. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.111, p.1161-1168, 2009.

TRINDADE, R.A.; MANCINI-FILHO, J.; VILLAVIVENCIO, A.L.C.H. Natural antioxidants protecting irradiated beef burgers from lipid oxidation. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.98-104, 2010.

UÇAK, I.; OZOGUL, Y.; DURMUS, M. The effects of rosemary extract combination with vacuum packing on the quality changes of Atlantic mackerel fish burgers. **International Journal of Food Science and Technology**, v.46, p.1157-1163, 2011.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: APHA, 1992, 1219p.

VILJANEN, K. et al. Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.7419-7424, 2004.

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

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

ZHANG, W.S. et al. Improving functional value of meat products. **Meat Science**, v.86, p.15-31, 2010.

Capítulo 4

RESUMO

Uso de extrato antioxidante natural obtido de erva aromática na elaboração de embutido cozido

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da adição de diferentes concentrações de extrato natural (*Origanum vulgare*) em relação à estabilidade oxidativa de linguiça cozida de carne de ovelha armazenada durante 135 dias a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, bem como definir a concentração mais promissora a partir de três diferentes métodos de determinação da capacidade antioxidante, buscando propriedades antioxidantes e apelo de saudabilidade. Foram elaborados cinco tratamentos: controle (CO), contendo eritorbato de sódio (ER) e três com extrato de orégano (N1 = 4964,51 ppm, N2 = 6630,98 ppm e N3 = 8038,20 ppm), definidas a partir de cálculos de equivalência em relação a capacidade antioxidante de 500 ppm de eritorbato de sódio, de acordo com resultados obtidos a partir dos métodos colorimétricos Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP, respectivamente. O extrato natural foi obtido por método convencional utilizando-se uma mistura de solventes (70% acetona, 28% água ultra pura e 2% ácido acético glacial), a partir de trituração, agitação, centrifugação, filtração, concentração, liofilização e ressuspensão em água. Inicialmente para caracterização, foi determinado o rendimento do processo de cozimento das linguiças, bem como a composição centesimal e foram submetidas a análises sensoriais (teste de diferença do controle). A estabilidade foi avaliada a partir de análises físico-químicas (pH, cor objetiva, análise de perfil de textura (TPA), oxidação lipídica [TBARS e índice de peróxidos] e protéica [carbonilas], perfil de ácidos graxos livres (AGL) e de compostos voláteis). Em relação à análise sensorial, visualmente as amostras CO diferiram em relação ao ER ($P<0,05$) e N3 ($P<0,01$), notando-se a manutenção da cor vermelha mais intensa nestas amostras. Apesar de mesmo comportamento no tempo inicial em relação aos valores a^* , houve diminuição ao longo do armazenamento para todos os tratamentos ($P<0,05$), porém não diferiram aos 135 dias ($P>0,05$), sendo observada uma tendência de efeito conservante da cor vermelha em ER, N2 e N3. Para TPA houve um aumento na dureza durante o armazenamento apenas para o tratamento CO ($P<0,01$). Linguiças cozidas com maior teor de extrato de orégano apresentaram valores mais baixos de

pH em comparação ao ER ao final da estocagem ($P < 0,01$). Em relação aos parâmetros oxidativos, N3 não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) para TBARS durante o armazenamento, notando-se uma maior tendência de inibição, além da formação de peróxidos ter sido mais lenta, juntamente com N2, em comparação ao CO e ER ($P < 0,001$), o que provavelmente atrasou a formação de compostos secundários. Quanto às carbonilas, observou-se tendência de maior eficiência antioxidante para tratamentos contendo extrato natural, entre 45 a 135 dias. Valores de AGL totais não diferiram entre CO e N3 ($P > 0,05$), e o tratamento N2 apresentou resultados satisfatórios compatíveis ao ER ($P > 0,05$), com relação às suas frações (AGS, AGM e AGPI), assim como para compostos voláteis demonstrando valores inferiores aos 135 dias ($P < 0,001$). Em conclusão, o extrato de orégano apresentou potencial antioxidante equivalente de eritorbato de sódio em níveis intermediário e alto (N2 e N3), definidos a partir dos métodos DPPH[•] e FRAP, não comprometendo a maioria dos parâmetros avaliados, o que permite a substituição de antioxidantes sintéticos, mantendo e/ou melhorando a qualidade nutricional e sensorial de produtos cozidos a base de carne ovina.

Palavras-chave: ácidos graxos livres, análise sensorial, compostos voláteis, estabilidade oxidativa, linguça, *Origanum vulgare*.

1 INTRODUÇÃO

Carnes e produtos cárneos são relevantes fontes de proteína de alta qualidade, cuja aceitação pelos consumidores depende principalmente da porcentagem de gordura, responsável por garantir características de sabor e textura. No entanto, apesar deste ponto positivo, a gordura pode prejudicar na qualidade nutricional e sensorial, pela grande susceptibilidade à degradação oxidativa (QI et al., 2015). Além disto, em carnes vermelhas, por ser fonte de ácidos graxos saturados, o maior teor de gordura promove a elevação do colesterol, principalmente pela predominância de ácido palmítico (PENNISI FORELL et al., 2010).

Devido às questões de segurança do alimento associadas com a prevalência de doenças crônicas e degenerativas, o uso de antioxidantes sintéticos está sendo

questionado atualmente (KIM et al., 2013). Assim, por uma crescente preocupação do próprio consumidor, inúmeras pesquisas estão em expansão com o intuito de encontrar alternativas naturais que sejam compatíveis aos antioxidantes sintéticos, e contribuam para o desenvolvimento de alimentos mais saudáveis e ao mesmo tempo que mantenham uma boa estabilidade (NAVEENA et al., 2008; NUNEZ DE GONZALEZ et al., 2008).

Para tanto, antioxidantes obtidos a partir dos vegetais, considerados fontes ricas em substâncias bioativas (TAYEL e EL-TRAS, 2012), estão sendo aplicados em carnes e seus derivados com grande eficácia na prevenção do processo oxidativo, cuja atividade se deve principalmente à presença de compostos fenólicos agindo como inibidores de radicais livres e quelantes de íons metálicos, por exemplo, cobre e ferro (BAGCHI et al., 2000; CHAN et al., 2014; COLINDRES e BREWER, 2011; DORMAN et al., 2003; JIA et al., 2012).

Recentemente, os intitulados “bioconservadores” são muito valorizados pela indústria alimentícia, sendo as especiarias consideradas ingredientes seguros e econômicos exercendo funções antimicrobianas e antioxidantes, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Dentre as ervas com maior potencial, o orégano (*Origanum vulgare* L.) é um ingrediente que contém fitoquímicos responsáveis por benefícios à saúde, além de estender a vida de prateleira e melhorar as características sensoriais dos alimentos (KRISHNAN et al., 2014b). No entanto, a eficácia do antioxidante depende de inúmeros fatores, tais como a concentração, estado físico do substrato, solubilidade, processamento e condições de armazenamento (McBRIDE, HOGAN e KERRY, 2007).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da adição de diferentes concentrações de extrato natural de orégano em relação à estabilidade oxidativa de linguiça cozida armazenada durante 135 dias a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, bem como definir a concentração mais promissora a partir de métodos de determinação da capacidade antioxidante (Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP), buscando propriedades antioxidantes e apelo de saudabilidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Matérias primas* (VER Capítulo 2 – subitem 2.1)

A carne e gordura de ovelhas para a elaboração do produto cárneo, foram adquiridas de Beealia – Cabrito y cordero de Galicia, empresa localizada em Lugo, na Espanha, que possui sistema de produção próprio com alimentação natural e segue métodos de abate humanitário.

2.2 *Preparo do extrato natural de orégano para análises de capacidade antioxidante e posterior elaboração de linguiças de ovelha* (VER Capítulo 2 – subitens 2.2 e 2.5)

2.3 *Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de orégano e eritorbato de sódio por métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH^{*} e FRAP* (VER Capítulo 2 – subitens 2.3.1 e 2.3.2)

2.4 *Cálculos de equivalência baseados em resultados de capacidade antioxidante* (VER Capítulo 2 – subitem 2.6 e Capítulo 3 – subitem 2.4)

2.5 *Determinação do pH do extrato de orégano*

As medições de pH foram realizadas com a utilização de um pHmetro portátil (Hanna Instruments, HI 221, Portugal) equipado com eletrodo de vidro (HI 1131P) combinado com sonda de temperatura (HI 7669/2W) com calibração para leituras em triplicata.

2.6 Elaboração de linguiças cozidas de ovelha

De acordo com a Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000 (BRASIL, 2000) que estabelece os “Padrões de Identidade e Qualidade de Linguiça”, os produtos cárneos foram elaborados com limites máximos ou mínimos para os teores de umidade (máx.=60%), gordura (máx.=35%) e proteína (mín.=14%).

Para atender a estes critérios, os embutidos foram produzidos utilizando carne magra de ovelha de descarte e gordura de ovelha (obtida da limpeza dos cortes cárneos utilizados), além de sal (NaCl), nitrito de sódio (Analar Normapur Prolabo, Reino Unido), tripolifosfato de sódio anidro (Scharlau, Espanha), condimento comercial veiculado em NaCl sabor linguiça calabresa (Exato Indústria e Comércio, Brasil) e dos antioxidantes específicos para cada tratamento, conforme Tabela 9.

Tabela 9 – Formulação das linguiças cozidas de ovelha.

Ingredientes	%
Carne de ovelha	75
Gordura de ovelha	23
Sal (NaCl)	0,75
Condimento pronto para linguiça	0,75
Nitrito de sódio	0,015
Tripolifosfato de sódio	0,15
Eritorbato de sódio/extrato de orégano	0,05
Total	100

FONTE: Brasil (2000).

A produção foi realizada na Planta-Piloto de Produtos Cárneos, do *Centro Tecnológico da Carne*, localizado em Ourense - Espanha, sendo elaborados 5 tratamentos: controle sem antioxidante (CO), contendo eritorbato de sódio (ER) (Alfa Aesar GmbH & Co. KG, França) e 3 com diferentes volumes de extrato de orégano (N1, N2 e N3), definidos conforme Capítulo 2 – subitem 2.6 e Capítulo 3 – subitem 2.4. O produto foi processado duas vezes, sendo que em cada repetição do experimento foram produzidos 15 kg de linguiça cozida.

Foram obtidas 6 carcaças de ovelhas mestiças provenientes de várias raças (mais comumente churro+ovella galega+charolais+berrinchon) com peso bruto total de 96,20 kg, com cada uma delas variando de 12 a 21,38 kg, e idade entre 6 a 12

anos. Foi realizada a desossa das carcaças e a separação da carne e gordura, apresentando o rendimento de 48,13 kg de carne e 11,20 kg de gordura, sendo embaladas a vácuo e mantidas em câmara a $-20\pm1^{\circ}\text{C}$ até o momento da elaboração dos embutidos. Estas foram descongeladas por 12 horas e picadas separadamente usando discos de 8 e 5 mm, respectivamente, em moedor (TOP-114, Talleres Ramon, S.L., Espanha), sendo submetidas a homogeneização em misturadeira a vácuo (AO-85, Fuerpa, Espanha) por 5 min. A massa foi acondicionada em câmara de refrigeração ($2\pm1^{\circ}\text{C}$) por 12 horas para processo de cura, separada em quantidades definidas para cada um dos tratamentos (3,50 kg).

Em equipamento automático (Junior, Sai, Espanha), as linguiças foram embutidas em tripas naturais suínas de calibres entre 28 a 32 mm, e separadas em gomos de aproximadamente 18 cm e com cerca de 150 gramas em amarradeira automática (ASM-120, Andher, Espanha). Posteriormente, o tratamento térmico foi realizado em estufa (SelfCooking Center SCC 101, Rational, Alemanha), programado a partir de 6 etapas com 100% de calor seco e velocidade do ar variável: 7 min a 55°C ; 25 min a 55°C ; 5 min a 70°C ; 30 min a 70°C ; 82°C até atingir 72°C internamente e resfriamento a 45°C até temperatura interna de 55°C . Posteriormente, as amostras foram embaladas a vácuo (V900, Sociedad Mercantil Tecselor, S.L., Espanha), em triplicatas por tratamento, e estocadas sob temperatura ambiente a $20\pm2^{\circ}\text{C}$ simulando condições comerciais. Na Figura 24 é apresentado o fluxograma de processamento das linguiças cozidas de ovelha.

Figura 24 – Fluxograma de processamento da linguiça cozida de ovelha.

Fonte: Própria autoria.

Linguiças cozidas, apesar de sofrerem apenas um tratamento térmico brando (pasteurização), podem ser armazenadas à temperatura ambiente devido à soma dos obstáculos que atuam neste produto e impedem sua deterioração. É possível citar, além do cozimento (pasteurização), os seguintes obstáculos: a redução da atividade de água, para em torno de 0,95 gerada pelo cozimento; a adição do nitrito de sódio, que evita a proliferação de microrganismos patogênicos, principalmente o *Clostridium botulinum* e a embalagem a vácuo, que impede a proliferação da maioria dos microrganismos deterioradores, que são aeróbios.

2.7 Análises para caracterização das linguiças de ovelha

Os produtos cárneos foram caracterizados quanto às análises abaixo descritas, apenas no tempo zero.

2.7.1 Rendimento do processo de cozimento

Após embutidas, as linguiças foram pesadas antes e após o cozimento (GT240/TYP 18A-M, Bizerba, Alemanha). O rendimento do processo foi calculado pela seguinte equação: $\text{Rendimento (\%)} = (\text{peso final} / \text{peso inicial}) \times 100$. Esta análise foi realizada nas 2 repetições do experimento para cada um dos tratamentos no dia do processamento.

2.7.2 Composição centesimal

Os teores de umidade, proteínas (Kjeldahl N x 6,25) e cinzas foram quantificados de acordo com as Normas Internacionais recomendadas 1442:1997 (ISO, 1997), 937:1978 (ISO, 1978) e 936:1998 (ISO, 1998), respectivamente, e o teor de lipídeos segundo AM 5-04 (A.O.C.S., 2005). As análises foram realizadas em triplicata para cada um dos tratamentos nas duas repetições.

A umidade foi calculada por perda de peso da amostra (5 g), mantida em estufa (UFP 600, Memmert, Alemanha) em cápsulas de aço inoxidável (Ø 65 mm e altura 25 mm) contendo areia de mar lavada (Panreac Química S.A., Espanha) a $102 \pm 2^\circ\text{C}$ até peso constante.

Quanto às proteínas, seu conteúdo foi determinado de acordo com método de nitrogênio total Kjeldahl, utilizando fator de conversão 6,25. A amostra (1 g) foi submetida a reação com ácido sulfúrico (sulfato de cobre utilizado como catalisador) em um bloco digestor (Gerhardt Kjeldatherm KB, Alemanha). Após a digestão da amostra, o nitrogênio orgânico foi transformado em sulfato de amônio, sendo destilado em condições alcalinas (Gerhardt Vapodest 50 Carrossel, Alemanha).

A porcentagem de cinzas foi calculada por perda de peso, sendo que as amostras (5 g) foram mantidas em mufla (RWF 1200, Carbolite, Inglaterra) em cápsulas de porcelana a 550°C para calcinação durante aproximadamente 5-6 horas até obtenção de cinzas brancas.

Para determinar a porcentagem de lipídeos, 2 g de amostras foram submetidas a extração líquido-sólida usando-se éter de petróleo em um extrator (Ankom XT10, Ankom Technology Corp., EUA) por 60 min em temperatura de 90-100°C em filtros resistentes ao calor, selados, que permitem a rápida penetração do solvente (XT4 filter bags, Ankom Technology Corp., EUA). O teor de gordura foi calculado pela diferença gravimétrica.

2.7.3 Análises sensoriais

A avaliação sensorial foi realizada apenas no tempo zero de armazenamento para as duas repetições com 14 provadores (4 homens e 10 mulheres) selecionados no *Centro Tecnológico da Carne* (Ourense, Espanha).

Todos os requisitos para a realização dos testes sensoriais foram cumpridos, de acordo com a Norma Internacional recomendada 8589:2007 (ISO 2007), apresentando uma área configurada para a aplicação dos testes e uma sala destinada para a preparação das amostras, seguindo-se orientações gerais destinadas à análise sensorial de produtos cárneos. Os provadores foram dispostos em cabines privadas, iluminadas com luz branca, oferecendo-se água e torrada para limpar o paladar e remover sabores residuais no início das sessões e entre cada uma das amostras.

As amostras foram fatiadas em pedaços de 0,8 cm de espessura em cortador de frios (SE12, Bizerba, Alemanha) e fritas por 2 min, 1 min de cada lado, a 180°C em uma frigideira de teflon. O delineamento em blocos casualizados foi utilizado de acordo com MacFie et al. (1989) e as amostras foram individualmente identificadas com números aleatórios de três dígitos, sendo a ordem de avaliação indicada nas fichas distribuídas aos provadores (Anexos 2 e 3).

De acordo com Meilgaard, Civille e Carr (2006), os produtos foram submetidos ao teste de diferença do controle para avaliação olfativa/gustativa (em 2 sessões), e visual (amostras fatiadas), utilizando-se a seguinte escala de categoria verbal: não há diferença, há uma diferença pequena, há uma pequena/moderada diferença, há uma diferença moderada, há uma moderada/grande diferença, há uma grande diferença e há uma diferença muito grande, sendo que para o cálculo dos

resultados, foi realizada a conversão em escala de categoria numérica de 0 a 6, respectivamente.

2.8 Análises físico-químicas

As amostras foram avaliadas no tempo zero e em 3 diferentes tempos de armazenamento após o processamento (45, 90 e 135 dias), conforme análises abaixo descritas, simulando condições comerciais. Para as 2 repetições do experimento, as amostras de cada um dos tratamentos foram avaliadas em triplicata para cada intervalo de tempo.

2.8.1 pH

As medidas de pH das amostras foram realizadas com a utilização de um pHmetro portátil (HI 99163, Hanna Instruments, Espanha) equipado com eletrodo de vidro para leituras com perfuração em 3 pontos diferentes.

2.8.2 Cor objetiva

As amostras de cada tratamento foram submetidas à avaliação de cor utilizando-se um colorímetro portátil (CM-600d, Konica Minolta Sensing, Japão) através da escala L^* , a^* , b^* , do sistema CIE Lab, utilizando-se o iluminante D_{65} , ângulo de observação de 10° e abertura de célula com 8 mm, para cálculo dos valores L^* , a^* e b^* médios de 3 leituras superficiais para cada amostra (CIE, 1978), sendo que antes das medidas o equipamento foi calibrado usando uma base de cerâmica branca. Além disto, a partir dos resultados obtidos, foram determinados os índices de intensidade de cor ou croma [$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0,5}$] e ângulo Hue [$H^* = \tan^{-1}(b^*/a^*) \cdot 57,29$] (HUNT et al., 1991; RIPOLL et al., 2013).

2.8.3 Oxidação lipídica

A estabilidade lipídica foi avaliada por meio do índice de peróxidos e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que permitem avaliar a oxidação lipídica primária e secundária, respectivamente.

O índice de peróxidos foi determinado pelo método oficial A.O.A.C. (965.33) de acordo com Horwitz e Latimer (2007), após extração de lipídeos pelo método de Bligh e Dyer (1959). Inicialmente, 1-2 g de gordura extraída foi dissolvida com 10 mL de triclorometano. Em seguida foram adicionados 15 mL de ácido acético e 1 mL de solução aquosa saturada de iodeto de potássio (KI), sendo a solução agitada lentamente por 1 min e mantida durante 5 min em repouso no escuro. Após incubação, 75 mL de água destilada foi adicionada e a amostra foi agitada vigorosamente. A reação do KI com peróxidos presentes na amostra promove a liberação do iodo, sendo que ao ser titulada com tiosulfato de sódio 0,01 N, em titulador automático (905 Titrand, Metrohm Ion Analysis, Suíça), valoram por diferença de potencial. Os resultados foram expressos em miliequivalentes mEq O₂/kg de gordura.

O conteúdo de TBARS foi utilizado para quantificar o estado de oxidação de gordura das amostras, a partir dos aldeídos formados no processo de oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados conforme método descrito por Vyncke (1975). Assim, 4 g de amostra foram homogeneizadas com 20 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 5% em Ultra-Turrax (T-25 basic digital, Ika, Alemanha) durante 2 min. O homogenato foi mantido a -20°C durante 10 min e centrifugado (Beckman Coulter Allegra X-22, Fullerton, EUA) a 2360 × g, durante 10 min. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de papel (nº 1, Whatman, Reino Unido). O filtrado (5 mL) reagiu com 5 mL de solução 0,2 M de ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo esta mistura agitada (ZX3, VELP SCIENTIFICA, Itália) e incubada a 96°C por 40 min em banho-maria. A absorbância foi medida a 532 nm, sendo os valores calculados a partir de curva padrão de malonaldeído com 1,1-3,3 tetraetoxipropano (TEP) 97% e os resultados expressos em mg de malonaldeído (MDA)/kg de amostra.

2.8.4 Oxidação protéica

A oxidação de proteínas foi mensurada à partir da determinação de conteúdo de grupos carbonílicos segundo metodologias descritas por Oliver et al. (1987), Villaverde, Ventanas e Estévez (2014) e Vuorela et al. (2005). 2,5 g de amostra foram homogeneizadas em 20 mL de solução de uréia 8 M durante 60 s utilizando um Ultra-Turrax (T25 basic, Ika, Alemanha). Duas alíquotas do homogenato (100 µL) foram transferidas para tubos eppendorf separadamente, sendo adicionada 1 mL de solução de TCA 10%. As amostras foram agitadas e centrifugadas a $5000 \times g$ durante 5 min. Para um dos precipitados resultantes foi adicionado 1 mL de HCl 2N (quantificação de proteína) e para o outro, 1 mL de solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) 0,2% em HCl a 2M (teor de carbonilas). Ambas as amostras foram incubadas em temperatura ambiente durante 1 h, sendo agitadas a cada 20 min. Em seguida, adicionou-se 0,8 mL de solução TCA a 10%, sendo agitadas, mantidas em repouso por 15 min a 4°C e centrifugadas novamente. O precipitado foi lavado três vezes consecutivas com 1 mL de etanol:acetato de etila (1:1, v/v), sendo posteriormente submetido a secagem *overnight*. O sedimento foi dissolvido em 1,5 mL de guanidina HCl 6 M, preparada com solução tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,5), sendo agitados e centrifugados por 5 min a $5000 \times g$ para precipitação dos fragmentos insolúveis. A concentração de proteínas foi quantificada em absorbância de 280 nm, a partir de curva padrão de calibração com albumina sérica bovina (BSA) e os resultados foram expressos em nmol de carbonilas/mg de proteína, utilizando coeficiente de adsorção de $21.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 370 nm.

2.8.5 Análises de Perfil de Textura (TPA)

Um texturômetro (TA.XTPlus, Stable Micro Systems, Reino Unido) foi usado para conduzir análises de perfil de textura (BOURNE, 1978) em que as amostras cortadas em pedaços de 1x1x2 cm (altura x largura x comprimento), foram submetidas a testes de compressão axial com uma sonda cilíndrica plana de 19,85

cm² de superfície de contato, movendo-se a velocidade constante de 10 mm/s até uma deformação de 50%.

As amostras foram avaliadas quanto aos valores de dureza (kg), elasticidade (mm), gomosidade (kg), coesividade e mastigabilidade (kg.mm), sendo estes parâmetros obtidos utilizando o software Texture Exponent.

2.8.6 Perfil de ácidos graxos livres (AGL)

Inicialmente os lipídeos foram extraídos a partir de 25 g de cada amostra triturada, usando clorofórmio:metanol (1:2, v/v), de acordo com procedimento de Bligh e Dyer (1959). Foi realizada a evaporação até a secura sob vácuo a 55°C e as amostras foram armazenadas a -20°C até a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG). Os ácidos graxos livres (AGL) foram separados a partir de 20 mg de lipídeos extraídos, utilizando mini colunas de NH₂-aminopropil de acordo com o procedimento descrito por García-Regueiro, Gilbert e Díaz (1994) e Kaluzny et al. (1985). A esterificação foi realizada com metóxido de sódio (2%) em metanol para a obtenção dos EMAG segundo Shehata, de Man e Alexander (1970). Após secagem total sob corrente de N₂, a separação e quantificação dos EMAG foram realizadas segundo Domínguez e Lorenzo (2014), em cromatógrafo a gás (GC-Agilent 6890N, Agilent Technologies Spain S.L., Espanha), equipado com um detector de ionização de chama e um injetor automático (HP 7683) utilizando coluna capilar de sílica fundida (SPTM-2560, Supelco Inc., EUA) contendo 100 m, 0,25 mm de diâmetro e 0,2 µm de espessura de película. As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura inicial da coluna a 120°C (mantida durante 5 min), programada para aumentar em uma taxa de 5°C/min até 200°C (mantida por 2 min), e em seguida, 1°C/min até temperatura final de 230°C (mantida por 3 min). O injetor e o detector permaneceram entre 260 e 280°C, respectivamente. Utilizou-se hélio como gás de arraste a uma taxa de fluxo constante de 1,1 mL/min com pressão na cabeça da coluna fixada em 35,56 psi. 1 µL de solução foi injetado em modo split (1:50) e os ácidos graxos foram quantificados utilizando ácido nonadecanóico (C19:0), em hexano a 5 mg/mL, como padrão interno que foi adicionado às amostras antes da separação da fração de AGL. A identificação foi realizada individualmente

por comparação dos tempos de retenção com os de padrões autenticados (Supelco 37 componente Fame Mix, Supelco Inc., EUA), sendo os resultados expressos em mg/g de lipídeos. Após quantificação, a proporção de ácidos graxos livres totais, saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) foram calculados.

2.8.7 Perfil de compostos voláteis

A determinação dos compostos voláteis foi realizada por microextração em fase sólida (HS-SPME) (Supelco, EUA), de acordo com Domínguez et al. (2014a) e Soto et al. (2008). Foi utilizado um dispositivo de SPME contendo fibra de sílica fundida (comprimento 10 mm) revestida com uma espessura de 50/30 nm de DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano) e as análises foram realizadas como se segue: para extração por *headspace* SPME (HS-SPME), 1 g de cada amostra foi pesada em frasco de 24 mL, após ser triturada em equipamento comercial (Moulinex/Swan Holding Ltd., Inglaterra).

Os frascos foram fechados com tampa de rosca, contendo um disco de teflon com septo de silicone (Supelco, EUA) e a amostra foi mantida em estufa a 35°C durante 15 min para assegurar homogeneidade com o espaço interior. A fibra SPME, previamente acondicionada por meio de aquecimento em porta de injeção do cromatógrafo de gás (Agilent Technologies, 6890N, EUA) a 270°C durante 60 min, foi exposta para dentro do frasco contendo a amostra através do septo e a extração foi efetuada a 35°C por 30 min. A fibra foi retirada para dentro da agulha e transferida para a porta de injeção do cromatógrafo a gás equipado com um detector seletivo de massas (Agilent Technologies, 5973N, EUA), sendo exposta e mantida a 260°C durante 8 min para separação em coluna capilar de 30 m, 0,25 mm de diâmetro e 1,4 µm de espessura de filme (DB-624, J&W Scientific, EUA), identificação e quantificação dos compostos adsorvidos.

A amostra foi injetada no modo splitless. O gás hélio foi utilizado como carreador com uma velocidade linear de 40 cm/s. A temperatura inicialmente programada foi isothermal de 40°C por 10 min, sendo aumentada para 200°C (5°C/min), e depois para 250°C (20°C/min), mantida por 5 min, totalizando tempo

final de 49,5 min para cada amostra. As temperaturas do injetor e do detector foram de 260°C e os espectros de massa foram obtidos a partir de detector seletivo de massas com impacto eletrônico de 70 eV, tensão multiplicadora de 1953 V e coleta de dados a 6,34 *scans/s* na faixa *m/z* de 40-300.

As condições cromatográficas foram descritas por Purriños et al. (2011) com modificações e os compostos foram identificados por comparação de seus espectros de massas com os contidos na biblioteca NIST05 (National Institute of Standards and Technology, EUA) e/ou comparando seus espectros de massas e tempo de retenção com padrões autênticos (Supelco, EUA), e/ou pelo cálculo do índice de retenção relativo a uma série de padrões de alcanos (C₅-C₁₉) para calcular índices Kovats (44585-U, Supelco, EUA) e combinando-os com os dados reportados na literatura. Os resultados foram expressos como unidades de área (UA) × 10⁶/g de matéria seca.

2.9 Análises Estatísticas e delineamento experimental

Para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos naturais, os ensaios para cada uma das 3 repetições foram realizados em triplicata e os resultados expressos em média±erro padrão, enquanto que para avaliação da estabilidade dos produtos cárneos, os ensaios das 2 repetições foram realizados em triplicata utilizando delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 4, ou seja, 5 tratamentos (CO, ER, N1, N2 e N3) avaliados em 4 tempos de estocagem (0, 45, 90 e 135 dias), cujos resultados foram expressos em média±erro padrão. Todos os resultados finais obtidos foram avaliados por análise de variância (ANOVA), utilizando-se o pacote estatístico SPSS (SPSS 17.0, Chicago, IL, USA), sendo que, em caso de diferença significativa, as médias foram comparadas através do teste de Duncan, ao nível de 5% de significância. As correlações entre as variáveis ($P < 0,05$) foram determinadas por análise de correlação através do coeficiente de correlação linear de Pearson com o pacote de software estatístico mencionado anteriormente. Para a análise sensorial, foi aplicado o teste de Dunnet bilateral descritivo (5%), verificando a existência da diferença do controle em relação aos outros tratamentos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de orégano e eritorbato de sódio por métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH^{*} e FRAP

Em relação à capacidade antioxidante do extrato de orégano e eritorbato de sódio, os resultados obtidos a partir dos métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH^{*} e FRAP podem ser visualizados na Tabela 10.

Tabela 10 – Capacidade antioxidante de extrato de orégano e eritorbato de sódio (média±erro padrão).

Método	Extrato natural	Eritorbato de sódio
Folin-Ciocalteu ¹	52,11±0,79	517,21±2,42
DPPH [*] 2	7,39±0,15	97,92±0,02
FRAP ³	344,09±5,24	5529,75±94,75

¹Resultados expressos em mg equivalente ácido gálico/g; ²Resultados expressos em g equivalente trolox (ET)/100 g; ³Resultados expressos em µmol ET/g de peso seco. (n = 3).

Fonte: Própria autoria.

Elevada capacidade antioxidante foi encontrada para o eritorbato de sódio, em média 13 vezes maior que o extrato de orégano. Em relação ao extrato de orégano, suas propriedades antioxidantes são decorrentes da composição de compostos fenólicos, dentre eles, ácido caféico, cumárico, rosmarínico, timol, linalol, carvacrol e quercetina (DANILA, GATEA e RADU, 2011). Os compostos fenólicos apresentam grupos hidroxila e ligações duplas conjugadas e por isso atuam como redutores, quelantes metálicos, inibidores de radicais livres e de O₂ singlete (MATHEW e ABRAHAM, 2006; OZTURK et al., 2007).

Tusevski et al. (2014) em estudo de propriedades antioxidantes de 27 ervas medicinais, comprovou que o extrato etanólico de orégano apresentou um maior teor de compostos fenólicos (123,41±8,77 mg EAG/g ps), superior ao resultado do presente estudo, e contendo relevante capacidade antioxidante, comprovado também pelo método DPPH^{*} (714,15±12,22 µmol ET/g ps). Estudos comprovam maior capacidade antioxidante do orégano em relação a outros extratos naturais por

métodos DPPH[•] (SHAN et al., 2005; ZHENG e WANG, 2001), assim como para FRAP (LAGOURI e NISTEROPOULOU, 2009).

Muitos outros estudos comprovam a alta eficiência antioxidante de extrato de orégano em relação a outras plantas (HOSSAIN et al., 2011; MIRON et al., 2011; SPIRIDON, BODIRLAU e TEACA, 2011). Entretanto, o potencial de extratos naturais depende do solvente e método a serem utilizados para o processo de extração (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2009), podendo promover alterações na atividade antioxidante e no conteúdo fenólico total (SHAH, BOSCO e MIR, 2014).

3.2 Cálculos de equivalência baseados em resultados de capacidade antioxidante

A partir dos resultados obtidos para Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP, foram calculadas as concentrações equivalentes para o extrato de orégano em relação ao eritorbato de sódio (500 ppm), sendo os valores médios obtidos em ppm convertidos para mL/kg de produto cárneo (Tabela 11).

Tabela 11 – Resultados de equivalências e volumes de extrato de orégano em relação ao eritorbato de sódio 500 ppm (média±erro padrão).

Método	Equivalência (ppm)	Volume (mL/kg)
Folin-Ciocalteu	4964,51±74,61	15,97±0,24
DPPH [•]	6630,98±136,19	21,33±0,44
FRAP	8038,20±122,48	25,86±0,39

(n = 3).

Fonte: Própria autoria.

Extratos de ervas e especiarias estão sendo bastante pesquisados quanto ao poder antioxidante (RODRÍGUEZ VAQUERO et al., 2010) e vários estudos envolvendo extratos naturais demonstram propriedades antioxidantes similares ou melhores em comparação aos antioxidantes sintéticos usados por outros autores em carnes e produtos cárneos (AHN, GRUN e FERNANDO, 2002; BAÑÓN et al., 2007; CHAN et al., 2014; COLINDRES e BREWER, 2011; KRISHNAN et al., 2014a; SHAH, BOSCO e MIR, 2014; TRINDADE, MANCINI-FILHO E VILLAVICENCIO, 2010).

3.3 pH do extrato de orégano

Foi realizada mensuração do pH do extrato de orégano utilizado para a elaboração dos produtos cárneos, obtendo-se valor de $3,94 \pm 0,04$ (média $\pm$ erro padrão).

3.4 Caracterização das linguiças de ovelha

3.4.1 Rendimento do processo de cozimento

O rendimento médio do processo foi de $93,57 \pm 1,82\%$ não diferindo significativamente entre os tratamentos ($P > 0,05$).

3.4.2 Composição centesimal

Resultados para a composição centesimal podem ser visualizados na Tabela 12. Não foram encontradas diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos para os teores de umidade, proteínas, lipídeos e cinzas, sendo que todas as amostras ficaram dentro dos limites máximos para umidade (60%) e lipídeos (35%) e mínimo de proteína (14%), conforme legislação brasileira (BRASIL, 2000).

Tabela 12 – Composição centesimal de linguiça cozida (média±erro padrão).

Tratamentos	Umidade (%)	Lipídeos (%)	Proteínas (%)	Cinzas (%)
CO	57,07±0,60	21,64±0,95	18,24±0,24	2,98±0,02
ER	57,46±0,62	21,60±1,25	18,46±0,26	3,05±0,02
N1	58,11±1,13	20,67±1,71	18,85±0,43	3,04±0,03
N2	57,37±0,73	22,26±1,52	18,23±0,15	2,95±0,02
N3	57,52±1,34	19,42±1,52	18,35±0,17	2,94±0,02

(n = 6).

Fonte: Própria autoria.

3.4.3 Análises sensoriais

As amostras foram submetidas ao teste de diferença do controle quanto à avaliação gustativa e olfativa, dividido em 2 sessões, sendo compostas por 2 controles e 2 tratamentos, e ao teste visual das amostras fatiadas, em que foram apresentadas 6 amostras, contendo 2 controles e mais 4 tratamentos, conforme visualizado na Figura 25.

Figura 25 – Apresentação das amostras para o teste de diferença do controle e visual utilizando escala de categoria verbal (n = 14).

Fonte: Própria autoria.

Os resultados obtidos para a avaliação gustativa/olfativa e visual podem ser visualizadas respectivamente nas Tabelas 13 e 14, demonstrando diferença significativa somente para o visual. Neste caso, houve diferença do controle em

comparação com o tratamento ER e contendo maior nível de extrato de orégano (N3), conforme diferenças de aparências notadas pelos provadores (Figura 26). Com isso, estas amostras foram favorecidas quanto à manutenção de uma coloração vermelha mais intensa em relação ao CO, sendo este um dos atributos mais importantes no momento da compra, podendo tornar o produto cárneo inaceitável para os consumidores (RENERRE, 2000).

Figura 26 – Avaliação visual das amostras fatiadas de linguiça cozida (n = 14).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 13 – Avaliação gustativa/olfativa de linguiça cozida através de teste de diferença do controle a partir de Dunnet (5%).

Tratamento	Significância	
ER	0,065	n.s.
N1	0,065	n.s.
N2	0,253	n.s.
N3	0,052	n.s.

Tratamentos: ER = eritorbato de sódio; N1 = Nível de extrato de orégano baseado em equivalência por método de Folin-Ciocalteu; N2 = Nível de extrato de orégano baseado em equivalência por método de DPPH; N3 = Nível de extrato de orégano baseado em equivalência por método de FRAP. Significância: *** ($P < 0,001$), ** ($P < 0,01$), * ($P < 0,05$), n.s. não significativo ($P \geq 0,05$). n = 14 provadores/tratamento/repetição.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 14 – Avaliação visual de linguiça cozida através de teste de diferença do controle a partir de Dunnet (5%).

Tratamento	Significância	
ER	0,025	*
N1	0,486	n.s.
N2	0,137	n.s.
N3	0,003	**

Tratamentos: ER = eritorbato de sódio; N1 = Nível de extrato de orégano baseado em equivalência por método de Folin-Ciocalteu; N2 = Nível de extrato de orégano baseado em equivalência por método de DPPH; N3 = Nível de extrato de orégano baseado em equivalência por método de FRAP. Significância: *** ($P < 0,001$), ** ($P < 0,01$), * ($P < 0,05$), n.s. não significativo ($P \geq 0,05$). n = 14 provadores/tratamento/repetição.

Fonte: Própria autoria.

3.5 Estabilidade físico-química

3.5.1 pH

Conforme pode ser visualizado na Tabela 15, ao longo do tempo de armazenamento houve redução significativa do pH para todos os tratamentos ($P<0,001$), e além disto notou-se que aos 0 ($P<0,05$), 45 ($P<0,05$) e 135 dias ($P<0,01$), as amostras apresentaram diferenças entre si, permanecendo ao final da estocagem com valores entre 5,8 e 6,2 (BRASIL, 1989).

Tabela 15 – Valores de pH entre tratamentos de linguiça cozida durante armazenamento (média±erro padrão).

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)				Sign.
	0	45	90	135	
CO	6,44±0,005 ^{b1,2}	6,12±0,01 ^{a2}	6,12±0,02 ^a	6,15±0,03 ^{a2,3}	***
ER	6,46±0,01 ^{c2}	6,08±0,02 ^{a1,2}	6,24±0,08 ^b	6,17±0,03 ^{ab3}	***
N1	6,45±0,004 ^{c1,2}	6,04±0,02 ^{a1}	6,20±0,07 ^b	6,07±0,02 ^{a1,2}	***
N2	6,43±0,003 ^{b1}	6,11±0,02 ^{a2}	6,18±0,06 ^a	6,11±0,04 ^{a2,3}	***
N3	6,44±0,005 ^{c1}	6,07±0,02 ^{a1,2}	6,19±0,05 ^b	6,01±0,01 ^{a1}	***
Sign.	*	*	n.s.	**	

a,b: Valores médios na mesma linha (correspondente ao mesmo tratamento) não seguido por letras comuns diferem significativamente ($P<0,05$).

1,2: Valores médios na mesma coluna (correspondente ao mesmo tempo de armazenamento) não seguido por números comuns diferem significativamente ($P<0,05$).

Tratamentos: CO: controle; ER: eritorbato de sódio; N1: extrato de oregano em concentração definida pelo método Folin-Ciocalteu; N2: extrato de oregano em concentração definida pelo método DPPH; N3: extrato de oregano em concentração definida pelo método FRAP.

Sign.= Significância: *** ($P<0,001$), ** ($P<0,01$), * ($P<0,05$), n.s. não significativo ($P\geq 0,05$) ($n = 6$).

Fonte: Própria autoria.

Aos 135 dias, pode-se observar uma maior tendência de acidez em amostras contendo extrato de orégano, sendo que o tratamento N3 apresentou menor valor ($P<0,01$) em comparação ao CO e ER, provavelmente devido à maior concentração de compostos bioativos, por exemplo, ácidos fenólicos, que mantiveram o pH do produto cárneo mais baixo (ALESON-CARBONELL et al., 2005). Contrariamente, Carpenter et al. (2007) observaram que o pH da carne suína cozida não foi afetado

pela adição de extratos de semente de uva e *bearberry*, mesmo estes apresentando-se ácidos, respectivamente com pH de 3,84 e 4,71.

Além disto, como mensurado anteriormente, o extrato de orégano apresentou-se ácido, o que provavelmente beneficiou nesta redução do valor de pH durante o armazenamento dos produtos cárneos, mantendo-se com esta característica, mesmo após o cozimento. Record e Lane (2001), constataram um aumento no teor de compostos fenólicos em extratos de chá após hidrólise ácida em estudos de simulação de digestão *in vitro*. Neste caso, e também em outros estudos com extratos de ervas, é confirmada a maior estabilidade de compostos fenólicos em meio ácido, simulando condições do trato gastrointestinal. Assim, o suco gástrico contribui para a extração destes compostos e consequentemente para a absorção de antioxidantes pelo organismo (GAWLIK-DZIKI, 2012; KOSAR, DORMAN e HILTUNEN, 2005).

3.5.2 Parâmetros de cor objetiva

Quanto aos parâmetros instrumentais de cor, estes foram mensurados na superfície das fatias de linguiça durante 135 dias de armazenamento. Com relação aos valores de a^* (cor vermelha), observou-se uma diminuição significativa ao longo do tempo para todos os tratamentos ($P < 0,05$) (Figura 27), variando de 15,54 a 7,14.

Este resultado indica a ocorrência da descoloração, assim como também verificado por Kim, Cho e Han (2013) em hambúrgueres bovinos contendo extratos vegetais verdes armazenados sob refrigeração por 12 dias. Este comportamento pode ser confirmado a partir da redução ocorrida nos valores de croma (intensidade da cor), juntamente com aumento significativo nos valores do ângulo Hue (tonalidade da cor) em todos os tratamentos ($P < 0,01$) (Tabela 16), devido à formação gradual de metamioglobina (FAUSTMAN et al., 2010). Segundo Fernández-Ginés et al. (2004) a deterioração da cor durante a estocagem pode ocorrer pela conversão de pigmentos cárneos totais a pigmentos nitrosos, sendo este processo favorecido em ambiente anaeróbio, segundo Sakata (2000).

Apesar de não apresentar diferenças significativas ao final da estocagem ($P < 0,05$), pode-se observar uma tendência de maior efeito conservante da cor

vermelha nos tratamentos ER, N2 e N3, e além disto, nenhum tratamento diferiu com relação ao L^* ($P>0,05$). Observou-se a tendência à menor degradação de pigmentos heme mesmo após processo de cocção, conforme constatado em estudos de Fernández-López et al. (2006), que avaliaram efeitos de extratos adicionados em carne suína cozida.

Valores de b^* (cor amarela) foram mantidos em N2 e N3 ($P>0,05$), e um aumento deste índice foi observado ao longo do armazenamento para os tratamentos CO, ER e N1 ($P<0,01$), indicando a maior formação da metamioglobina devido a oxidação dos pigmentos da cor (LUCIANO et al., 2009). Diferentemente, Ahn, Grün e Mustapha (2007), verificou que amostras de carne bovina moída e cozida contendo BHA/BHT, a cor amarela foi mantida durante refrigeração, enquanto que produtos contendo extratos de semente de uva e de casca de pinheiro, b^* foi reduzido significativamente, demonstrando maior eficiência antioxidante. Não houve diferença entre as amostras aos 135 dias de armazenamento ($P>0,05$).

Figura 27 – Parâmetros de cor objetiva de linguiça cozida durante armazenamento (n = 6).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 16 – Evolução da intensidade e tonalidade entre tratamentos de linguiça cozida durante armazenamento (média±erro padrão).

Tratamento		Tempo de armazenamento (dias)				Sign.
		0	45	90	135	
CROMA	CO	18,08±0,37 ^b	15,62±0,42 ^a	15,27±0,24 ^{a1,2}	15,17±0,42 ^a	***
	ER	18,63±0,24 ^b	16,19±0,62 ^a	16,12±0,52 ^{a2}	15,42±0,44 ^a	**
	N1	18,42±0,43 ^b	15,01±0,32 ^a	14,67±0,25 ^{a1}	15,32±0,22 ^a	***
	N2	18,16±0,27 ^b	15,12±0,51 ^a	14,69±0,24 ^{a1}	15,38±0,64 ^a	***
	N3	18,27±0,22 ^b	15,02±0,22 ^a	14,88±0,27 ^{a1}	15,04±0,48 ^a	***
	Sign.	n.s.	n.s.	*	n.s.	
HUE	CO	35,01±0,60 ^{a1}	53,89±5,60 ^b	63,16±5,60 ^b	61,34±5,67 ^b	**
	ER	33,44±0,48 ^{a1}	49,65±4,01 ^b	51,00±4,43 ^b	50,51±3,55 ^b	**
	N1	36,75±0,81 ^{a2}	53,10±2,13 ^b	53,61±4,47 ^b	59,75±2,01 ^b	***
	N2	36,86±0,85 ^{a2}	52,85±2,56 ^b	53,73±3,98 ^b	53,28±3,20 ^b	**
	N3	36,93±0,58 ^{a2}	51,32±1,97 ^b	51,19±3,11 ^b	53,68±1,72 ^b	***
	Sign.	**	n.s.	n.s.	n.s.	

a,b: Valores médios na mesma linha (correspondente ao mesmo tratamento) não seguido por letras comuns diferem significativamente ($P<0,05$).

1,2: Valores médios na mesma coluna (correspondente ao mesmo tempo de armazenamento) não seguido por números comuns diferem significativamente ($P<0,05$).

Tratamentos: CO: controle; ER: eritorbato de sódio; N1: extrato de orégano em concentração definida pelo método Folin-Ciocalteu; N2: extrato de orégano em concentração definida pelo método DPPH; N3: extrato de orégano em concentração definida pelo método FRAP.

Sign.= Significância: *** ($P<0,001$), ** ($P<0,01$), * ($P<0,05$), n.s. não significativo ($P\geq 0,05$) ($n = 6$).

Fonte: Própria autoria.

3.5.3 Análises de perfil de textura (TPA)

O perfil de textura dos produtos cárneos (dureza, elasticidade, mastigabilidade, gomosidade e coesividade) pode ser visualizado na Tabela 17. Conforme resultados obtidos, observou-se aumento na dureza ao longo do período de estocagem somente para o tratamento CO ($P<0,01$), de 11,80±0,60 para 15,15±0,45 kg, sendo que os outros atributos não foram afetados ($P>0,05$) através da adição de antioxidantes.

Tabela 17 – Perfil de textura de linguiça cozida durante armazenamento (média±erro padrão).

Variáveis	Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)				Sign.
		0	45	90	135	
Dureza (kg)	CO	11,80±0,60 ^a	13,99±0,66 ^{bc}	12,66±0,60 ^{ab}	15,15±0,45 ^c	**
	ER	12,87±0,58	14,10±0,56	13,06±0,71	13,46±0,84	n.s.
	N1	12,18±0,27	13,77±0,98	12,12±0,35	13,48±0,78	n.s.
	N2	12,58±0,38	13,97±0,55	13,13±0,52	14,60±0,61	n.s.
	N3	13,70±0,21	15,25±0,57	14,04±0,49	14,58±0,35	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
Elasticidade (mm)	CO	0,84±0,01	0,85±0,01	0,85±0,004	0,85±0,01	n.s.
	ER	0,85±0,01	0,87±0,01	0,86±0,01	0,85±0,01	n.s.
	N1	0,85±0,01	0,85±0,01	0,86±0,01	0,84±0,01	n.s.
	N2	0,85±0,01	0,84±0,01	0,84±0,01	0,85±0,01	n.s.
	N3	0,86±0,01	0,86±0,01	0,84±0,01	0,84±0,01	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
Mastigabilidade (kg.mm)	CO	0,69±0,04	0,62±0,03	0,61±0,02	0,61±0,02	n.s.
	ER	0,64±0,02	0,63±0,02	0,63±0,02	0,62±0,02	n.s.
	N1	0,61±0,02	0,61±0,04	0,59±0,04	0,61±0,02	n.s.
	N2	0,62±0,02	0,61±0,03	0,63±0,02	0,60±0,03	n.s.
	N3	0,62±0,02	0,63±0,02	0,62±0,02	0,60±0,02	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
Gomosidade (kg)	CO	7,47±0,37 ¹	8,76±0,64	7,46±0,62	9,03±0,32	n.s.
	ER	8,54±0,51 ^{1,2}	8,64±0,66	8,02±0,69	8,70±0,80	n.s.
	N1	7,38±0,35 ¹	7,90±0,92	7,21±0,42	8,28±0,64	n.s.
	N2	8,06±0,47 ^{1,2}	8,33±0,61	8,57±0,58	8,87±0,69	n.s.
	N3	9,01±0,31 ²	10,03±0,42	9,36±0,45	8,78±0,36	n.s.
	Sign.	**	n.s.	n.s.	n.s.	
Coesividade	CO	7,47±0,37	8,76±0,64	7,46±0,62	9,03±0,32	n.s.
	ER	8,21±0,47	8,64±0,66	8,02±0,69	8,70±0,80	n.s.
	N1	7,38±0,35	7,90±0,92	7,21±0,42	8,28±0,64	n.s.
	N2	8,06±0,47	8,33±0,61	8,57±0,58	8,87±0,69	n.s.
	N3	8,39±0,30	10,03±0,42	9,36±0,45	8,78±0,36	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

Tratamentos: CO: controle; ER: eritorbato de sódio; N1: extrato de orégano em concentração definida pelo método Folin-Ciocalteau; N2: extrato de orégano em concentração definida pelo método DPPH; N3: extrato de orégano em concentração definida pelo método FRAP.

^{a,b,c}: Valores médios na mesma linha (correspondente ao mesmo tratamento) não seguido por letras comuns diferem significativamente ($P<0,05$).

^{1,2}: Valores médios na mesma coluna (correspondente ao mesmo tempo de armazenamento) não seguido por números comuns diferem significativamente ($P<0,05$).

Sign.= Significância: *** ($P<0,001$), ** ($P<0,01$), * ($P<0,05$), n.s. não significativo ($P\geq 0,05$) ($n = 6$).

Fonte: Própria autoria.

Este comportamento foi visível provavelmente devido à intensa oxidação protéica ocorrida aos 45 dias em comparação às outras amostras, reduzindo mais rapidamente a capacidade de retenção de água, o que influenciou diretamente na textura, deixando-as menos tenras em relação ao valor inicial encontrado (ESTÉVEZ, 2011). Neste caso, a etapa de cozimento possivelmente contribuiu para

este comportamento, já que danos oxidativos de proteínas conduzem a alterações estruturais a partir do encolhimento das fibras musculares, destruição de membranas celulares, além da ocorrência de ligações cruzadas devido à agregação entre proteínas e formação de complexos com formação de gel, gerando impactos sobre a solubilidade (TORNBERG, 2005).

Apesar de não serem detectadas diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos tempos de armazenamento avaliados ($P>0,05$), notou-se uma menor tendência à dureza para os tratamentos contendo antioxidantes aos 135 dias.

3.5.4 Oxidação lipídica

Conforme pode ser visualizado na Figura 28, ao longo do período avaliado, todas as amostras, exceto N3, apresentaram diferença significativa ($P<0,05$) para TBARS. Este tratamento que manteve valores constantes (0,07-0,15 mg MDA/kg), provavelmente devido à maior concentração de antioxidante natural, apresentou uma tendência de inibição da oxidação lipídica ao longo do tempo, porém, não diferiu dos outros tratamentos aos 135 dias ($P>0,05$), assim como constatado por Cando et al. (2014), em que valores de TBARS não foram diferentes em produto cárneo cozido sem antioxidantes e contendo níveis mais altos de extrato natural.

Figura 28 – Oxidação lipídica para análise de TBARS de linguiça cozida durante armazenamento (n = 6).

Fonte: Própria autoria.

O tratamento CO apresentou um aumento ($P < 0,01$), do tempo zero ($0,06 \pm 0,01$ mg MDA/kg) aos 135 dias de armazenamento ($0,12 \pm 0,01$ mg MDA/kg), enquanto que aqueles contendo antioxidantes (ER, N1 e N2), apesar de sofrerem variações, não diferiram quando comparados inicialmente e ao final da estocagem, concordando com Álvarez et al. (2009) que afirmam a inibição do processo de oxidação lipídica com a adição de antioxidantes naturais mesmo em baixas concentrações.

Entretanto, todos os valores permaneceram abaixo do limiar estabelecido para a aceitação em carnes, entre 1 e 2 mg MDA/kg de amostra (CAMPO et al., 2006; GOBERT et al., 2010), assim como também verificado por Berasategi et al. (2014), ao estudarem produto cozido a base de carne suína com reduzido teor de gordura, incluindo tratamentos contendo BHA e *Melissa officinalis*, que apresentaram TBARS abaixo de 0,5 mg MDA/kg de produto.

Além dos baixos valores encontrados, não houve diferença significativa entre os tratamentos para nenhum intervalo de tempo ($P > 0,05$) e provavelmente este comportamento pode ser justificado pela ocorrência da oxidação primária (peróxidos) durante a etapa de cozimento dos produtos cárneos levando à formação de compostos secundários mais rapidamente e consequentemente ao quase

esgotamento dos TBARS durante este processo. Contrariamente, Ozvural e Vural (2012), verificaram que o aumento da concentração do extrato de semente de uva promoveu redução de TBARS em salsichas *frankfurters*, devido ao maior teor de compostos antioxidantes.

Durante o armazenamento, observou-se variação significativa para todas as amostras ($P < 0,05$), sendo que houve uma redução ($P < 0,001$) na formação de peróxidos para os tratamentos CO e ER de $17,05 \pm 0,52$ e $13,75 \pm 1,00$ para $2,52 \pm 0,49$ e $2,36 \pm 0,19$ mEq/kg, respectivamente, não diferindo entre si aos 135 dias ($P > 0,001$) (Figura 29). Esta redução sugere a reação ocorrida durante o tratamento térmico, originando compostos de oxidação secundários (BERASATEGI et al., 2011). No caso do CO, devido à maior formação de peróxidos no tempo inicial em comparação às outras amostras ($P < 0,001$), bem como a decomposição mais rápida destes, apresentou maior susceptibilidade à oxidação com aumento de TBARS ao longo do tempo ($P < 0,01$), conforme anteriormente descrito.

Figura 29 – Índice de peróxidos de linguiça cozida durante armazenamento (n = 6).

Fonte: Própria autoria.

Apesar de diferenças encontradas durante estocagem ($P < 0,01$) apenas N1 não diferiu significativamente no tempo inicial ($8,50 \pm 1,23$ mEq/kg) e aos 135 dias ($6,98 \pm 0,25$ mEq/kg), apresentando inicialmente um valor mais alto e ao final do armazenamento uma menor formação de compostos, em comparação ao N2 e N3

($P < 0,001$). Assim, os tratamentos N2 e N3 apresentaram inicialmente menores valores ($2,04 \pm 0,43$ e $2,80 \pm 0,89$ mEq/kg, respectivamente) em relação às outras amostras e maiores valores ao final ($8,55 \pm 0,42$ e $8,22 \pm 0,15$ mEq/kg, respectivamente) ($P < 0,001$). Neste caso, a formação dos peróxidos foi mais lenta para estes provavelmente devido às maiores concentrações de compostos bioativos que retardaram o processo oxidativo secundário nestas amostras. O aumento é justificável pela formação dos compostos, mesmo que lenta, em relação à decomposição destes, contrariamente ao CO e ER, em que ocorreu uma decomposição mais rápida à medida que se formaram (AKARPAT, TURHAN e USTUN, 2008; GEORGANTELIS et al., 2007). Assim, pode-se comprovar que as ervas apresentam um grande potencial antioxidante na eliminação de espécies reativas de O_2 ou de quelatos de íons metálicos e consequentemente na inibição da peroxidação lipídica (GAWLIK-DZIKI, 2012), em relação ao ER.

3.5.5 Oxidação protéica

Inicialmente, no tempo zero, ER, N2 e N3 apresentaram valores mais baixos quanto à formação de carbonilas ($6,62 \pm 0,14$, $6,86 \pm 0,13$ e $6,39 \pm 0,18$ nmol/mg, respectivamente) em relação aos tratamentos CO e N1 ($P < 0,001$), que não diferiram entre si com respectivos valores de $7,50 \pm 0,17$ e $7,75 \pm 0,25$ nmol/mg.

Houve diferença significativa ao longo do tempo ($P < 0,001$), ocorrendo um rápido aumento aos 45 dias para todos os tratamentos (Figura 30), possivelmente devido ao processo de cocção, que aumentou a carbonilação protéica em consequência à desnaturação celular provavelmente ocorrida no tempo zero (ESTÉVEZ, 2011). Este comportamento indicou que a degradação da globina e clivagem do pigmento hematina beneficiam a liberação de ferro heme que promoveram alterações na coloração dos produtos cárneos, conforme Estévez e Cava (2004).

Este incremento foi significativamente maior para CO ($P < 0,001$), com valor de $19,84 \pm 0,89$ nmol/mg de proteína aos 45 dias, notando-se ao final da estocagem, a redução na formação de carbonilas ($13,39 \pm 0,82$ nmol/mg), sugerindo a degradação destas em outros compostos oxidativos, já que a tendência foi de diminuição.

Similarmente a este estudo, Roldan et al. (2014), avaliando a ocorrência da oxidação protéica de lombo de cordeiro cozido, detectou a degradação das carbonilas à partir de reações com outros componentes que promovem a redução destes compostos, por exemplo, com a formação de ligações cruzadas.

Figura 30 – Formação de carbonilas em língua cozida durante armazenamento (n = 6).

Fonte: Própria autoria.

Apesar de não diferirem significativamente entre si ($P > 0,05$) ao final do armazenamento ($P > 0,05$), comparando-se os tratamentos aos 45 e 135 dias, notou-se a crescente formação de compostos para ER (de $14,40 \pm 0,34$ a $17,41 \pm 0,47$ nmol/mg) ($P < 0,001$), apresentando uma tendência de menor eficiência antioxidante se comparado aos tratamentos contendo antioxidantes naturais, que permaneceram com valores constantes, possivelmente devido à inibição da degradação protéica pela ação de compostos fenólicos presentes no extrato, durante cozimento ou armazenamento, a partir da formação de complexos destes com as proteínas (ESTÉVEZ, VENTANAS e CAVA, 2006). Em outras palavras, sugere-se que a oxidação protéica foi mais rápida para os tratamentos CO, seguida das amostras contendo ER e por último dos tratamentos contendo extrato natural, que apresentaram reação oxidativa mais lenta. Além disto, aos 135 dias, o tratamento N3

apresentou uma tendência de menor formação de grupos carbonilas, o que sugere maior inibição oxidativa devido à maior eficiência em relação à concentração do extrato natural.

3.5.6 Perfil de ácidos graxos livres (AGL)

Na Tabela 18 podem ser observadas as alterações ocorridas no conteúdo dos diferentes AGL, durante o tempo de armazenamento da linguiça cozida, sendo que os de maior predominância ao final da estocagem, dentre os 20 detectados foram oléico (C18:1n9), palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), em ordem decrescente, similarmente à tendências de perfil encontradas por outros estudos durante elaboração de produtos cárneos (GÓMEZ e LORENZO, 2013; LORENZO, GÓMEZ e FONSECA, 2014; MURIEL et al., 2007; PATEIRO et al., 2014).

Tabela 18 – Alterações de ácidos graxos livres em linguiça cozida durante armazenamento (média±erro padrão). (continua)

AGL	Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)				Sign.
		0	45	90	135	
C14:0	CO	1,13±0,07 ^a	1,25±0,05 ^a	1,63±0,06 ^{b1}	2,04±0,14 ^c	***
	ER	1,36±0,06 ^a	1,31±0,05 ^a	1,67±0,11 ^{ab1}	1,81±0,14 ^b	*
	N1	1,48±0,11 ^a	1,40±0,04 ^a	1,93±0,23 ^{b1,2}	1,76±0,05 ^{ab}	*
	N2	1,42±0,08	1,41±0,09	1,74±0,09 ¹	1,56±0,15	n.s.
	N3	1,29±0,08 ^a	1,36±0,04 ^a	2,29±0,14 ^{b2}	1,92±0,11 ^b	***
	Sign.	n.s.	n.s.	*	n.s.	
C14:1n5	CO	0,17±0,02 ^a	0,17±0,01 ^a	0,18±0,03 ^a	0,54±0,04 ^b	***
	ER	0,18±0,01 ^a	0,17±0,02 ^a	0,16±0,01 ^a	0,50±0,04 ^b	***
	N1	0,17±0,01 ^a	0,16±0,00 ^a	0,15±0,03 ^a	0,47±0,02 ^b	***
	N2	0,21±0,01 ^a	0,18±0,03 ^a	0,16±0,01 ^a	0,41±0,06 ^b	***
	N3	0,18±0,02 ^a	0,19±0,02 ^a	0,17±0,01 ^a	0,57±0,07 ^b	***
	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
C15:0	CO	0,32±0,02 ^a	0,35±0,04 ¹	0,37±0,04 ¹	0,51±0,05	n.s.
	ER	0,37±0,03	0,34±0,03 ¹	0,39±0,02 ^{1,2}	0,39±0,01	n.s.
	N1	0,35±0,03	0,32±0,02 ¹	0,32±0,03 ¹	0,36±0,03	n.s.
	N2	0,33±0,03	0,37±0,02 ¹	0,37±0,02 ¹	0,36±0,02	n.s.
	N3	0,35±0,02	0,46±0,05 ²	0,48±0,03 ²	0,51±0,07	n.s.
	Sign.	n.s.	*	*	n.s.	
C16:0	CO	12,32±1,52 ^{a1}	15,09±2,05 ^{ab}	17,70±1,24 ^{ab}	20,54±2,28 ^{c2}	*

(continuação)

AGL	Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)				Sign.
		0	45	90	135	
C16:1n-7	ER	18,50±1,64 ²	15,15±1,60	16,71±1,48	14,64±0,88 ¹	n.s.
	N1	15,85±1,59 ^{1,2}	15,28±1,17	14,78±1,25	14,77±1,12 ¹	n.s.
	N2	14,04±1,58 ^{1,2}	13,78±1,65	18,12±1,09	14,98±1,39 ¹	n.s.
	N3	12,21±0,98 ^{a1}	14,47±1,34 ^{ab}	19,74±1,70 ^c	18,58±1,42 ^{bc1,2}	**
	Sign.	*	n.s.	n.s.	*	
	CO	1,61±0,19	1,89±0,31	2,00±0,13	2,08±0,28	n.s.
	ER	2,14±0,14	1,71±0,12	2,00±0,21	1,71±0,15	n.s.
	N1	1,94±0,15	1,64±0,13	1,84±0,32	1,88±0,10	n.s.
	N2	1,89±0,21	1,48±0,13	1,97±0,10	1,75±0,18	n.s.
	N3	1,49±0,11 ^a	1,94±0,21 ^{ab}	2,36±0,15 ^b	2,37±0,19 ^b	**
C17:0	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
	CO	0,59±0,06 ^a	0,54±0,05 ^{a1}	0,74±0,08 ^{ab1}	0,91±0,08 ^{b1}	**
	ER	0,59±0,07 ^a	0,58±0,05 ^a	0,79±0,06 ^{b1}	0,79±0,07 ^{b1}	*
	N1	0,59±0,05 ^a	0,61±0,01 ^a	0,72±0,09 ^{ab1}	0,84±0,06 ^{b1}	**
	N2	0,56±0,04	0,66±0,02	0,74±0,03 ¹	0,70±0,08 ¹	n.s.
	N3	0,54±0,04 ^a	0,70±0,07 ^a	1,01±0,04 ^{b2}	1,17±0,10 ^{b2}	***
	Sign.	n.s.	n.s.	*	**	
	CO	0,36±0,05	0,45±0,07	0,49±0,05 ¹	0,53±0,05 ^{1,2}	n.s.
	ER	0,32±0,05 ^a	0,37±0,04 ^{ab}	0,48±0,04 ^{b1}	0,50±0,05 ^{b1,2}	*
	N1	0,36±0,04	0,35±0,02	0,40±0,05 ¹	0,48±0,05 ¹	n.s.
C17:1n-7	N2	0,45±0,06	0,41±0,02	0,48±0,02 ¹	0,42±0,05 ¹	n.s.
	N3	0,34±0,03 ^a	0,54±0,07 ^b	0,62±0,04 ^{b2}	0,65±0,06 ^{b2}	**
	Sign.	n.s.	n.s.	*	*	
	CO	8,88±0,74 ^{a1,2}	8,80±0,95 ^a	11,14±1,11 ^{ab}	13,28±1,21 ^{b2}	*
	ER	11,20±1,14 ²	10,20±0,75	10,45±0,75	9,79±0,83 ¹	n.s.
	N1	10,33±0,65 ^{1,2}	9,15±0,64	8,94±1,24	9,83±1,00 ¹	n.s.
	N2	8,26±0,65 ¹	9,60±0,78	10,47±0,36	9,23±1,17 ¹	n.s.
	N3	7,98±0,59 ^{a1}	10,58±1,09 ^{ab}	12,03±0,87 ^{bc}	14,08±1,28 ^{c2}	**
	Sign.	*	n.s.	n.s.	*	
	CO	0,40±0,06	0,36±0,04	0,35±0,03 ¹	0,28±0,05	n.s.
C18:0	ER	0,41±0,04	0,34±0,03	0,38±0,03 ¹	0,32±0,04	n.s.
	N1	0,34±0,02 ^a	0,45±0,04 ^b	0,30±0,03 ^{a1}	0,38±0,03 ^{ab}	*
	N2	0,30±0,03	0,38±0,03	0,33±0,05 ¹	0,30±0,04	n.s.
	N3	0,29±0,04 ^a	0,37±0,03 ^a	0,55±0,05 ^{b2}	0,36±0,06 ^a	*
	Sign.	n.s.	n.s.	**	n.s.	
	CO	1,05±0,18 ^a	1,46±0,25 ^{ab}	1,88±0,28 ^{bc1}	2,46±0,28 ^c	**
	ER	1,15±0,15 ^a	1,42±0,15 ^{ab}	1,98±0,21 ^{bc1,2}	2,21±0,25 ^c	**
	N1	1,01±0,06 ^a	1,29±0,08 ^a	1,46±0,20 ^{a1}	2,09±0,25 ^b	**
	N2	1,16±0,05 ^a	1,44±0,10 ^a	1,90±0,12 ^{b1}	2,05±0,22 ^b	**
	N3	1,04±0,13 ^a	2,07±0,31 ^b	2,53±0,17 ^{bc2}	2,94±0,25 ^c	***
C18:1n-9t	Sign.	n.s.	n.s.	*	n.s.	
	CO	17,70±1,59 ^{a1,2}	19,47±2,55 ^a	27,61±1,31 ^b	28,36±3,58 ^b	*
	ER					
	N1					
	N2					
	N3					
	Sign.					
	CO					
	ER					
	N1					
C18:1n-11t	N2					
	N3					
	Sign.					
	CO					
	ER					
	N1					
	N2					
	N3					
	Sign.					
	CO					

(continuação)

AGL	Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)				Sign.
		0	45	90	135	
C18:1n-7c	ER	26,32±2,02 ³	23,49±1,79	23,66±2,45	23,53±2,89	n.s.
	N1	23,45±1,41 ³	20,46±2,19	23,59±3,94	24,94±1,87	n.s.
	N2	21,88±2,24 ^{2,3}	20,77±2,16	27,13±2,11	20,64±3,05	n.s.
	N3	16,30±1,12 ¹	23,28±2,34 ^b	30,42±1,86 ^b	29,86±3,14 ^b	**
	Sign.	**	n.s.	n.s.	n.s.	
	CO	0,91±0,12 ¹	0,97±0,10	1,29±0,13	1,09±0,10	n.s.
	ER	1,52±0,15 ²	1,12±0,12	1,18±0,20	0,96±0,07	n.s.
	N1	1,23±0,17 ^{1,2}	1,37±0,23	1,47±0,34	0,91±0,07	n.s.
	N2	0,96±0,13 ¹	1,20±0,26	1,37±0,21	0,89±0,10	n.s.
	N3	0,92±0,12 ¹	1,10±0,16	1,26±0,13	1,04±0,08	n.s.
C18:2n-6t	Sign.	*	n.s.	n.s.	n.s.	
	CO	0,28±0,03	0,23±0,04	0,28±0,03	0,26±0,04 ¹	n.s.
	ER	0,25±0,04	0,24±0,03	0,29±0,04	0,23±0,02 ¹	n.s.
	N1	0,23±0,02	0,24±0,01	0,27±0,04	0,24±0,03 ¹	n.s.
	N2	0,24±0,02	0,20±0,01	0,25±0,02	0,22±0,03 ¹	n.s.
	N3	0,23±0,02 ^a	0,26±0,04 ^{ab}	0,36±0,05 ^b	0,47±0,04 ^{c2}	**
	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	***	
	CO	4,32±0,71 ¹	3,25±0,17	4,68±0,41	3,73±0,61	n.s.
	ER	6,39±0,84 ^{b2}	4,19±0,79 ^a	3,72±0,45 ^a	2,90±0,14 ^a	**
	N1	4,59±0,71 ^{1,2}	3,72±0,59	4,57±0,88	2,76±0,25	n.s.
C18:2n-6c	N2	4,07±0,58 ¹	3,44±0,77	4,13±0,47	2,81±0,28	n.s.
	N3	3,03±0,21 ¹	3,41±0,39	4,03±0,65	2,87±0,17	n.s.
	Sign.	*	n.s.	n.s.	n.s.	
	CO	0,22±0,01	0,23±0,02	0,23±0,02	0,20±0,01	n.s.
	ER	0,28±0,02 ^b	0,26±0,01 ^b	0,21±0,01 ^a	0,21±0,01 ^a	**
	N1	0,24±0,02	0,23±0,01	0,22±0,03	0,21±0,01	n.s.
	N2	0,23±0,01	0,25±0,02	0,22±0,01	0,20±0,01	n.s.
	N3	0,25±0,01	0,24±0,02	0,21±0,01	0,22±0,02	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
	CO	0,23±0,02 ^{a1}	0,49±0,02 ^b	0,72±0,08 ^b	0,87±0,09 ^b	***
C20:1n-9	ER	0,46±0,02 ^{a2}	0,64±0,06 ^{ab}	0,79±0,11 ^b	0,66±0,06 ^{ab}	*
	N1	0,28±0,02 ^{a1}	0,66±0,05 ^b	0,58±0,09 ^b	0,59±0,04 ^b	**
	N2	0,31±0,07 ^{a1}	0,70±0,07 ^b	0,82±0,06 ^b	0,66±0,04 ^b	***
	N3	0,33±0,05 ^{a1,2}	0,88±0,09 ^b	0,93±0,09 ^b	0,78±0,05 ^b	***
	Sign.	*	n.s.	n.s.	n.s.	
	CO	0,75±0,09 ^{1,2}	0,44±0,09 ^{2,3}	0,41±0,10	0,58±0,09	n.s.
	ER	0,93±0,09 ^{b2}	0,29±0,03 ^{a1,2}	0,36±0,06 ^a	0,45±0,07 ^a	***
	N1	0,67±0,07 ^{c2}	0,26±0,01 ^{a1}	0,42±0,01 ^{ab}	0,47±0,07 ^b	***
	N2	0,79±0,04 ^{b1,2}	0,35±0,02 ^{a1,2}	0,37±0,04 ^a	0,39±0,07 ^a	***
	N3	0,58±0,07 ¹	0,54±0,08 ³	0,57±0,02	0,64±0,06	n.s.
C18:3n-3	Sign.	*	*	n.s.	n.s.	
	CO	0,18±0,02	0,17±0,02	0,20±0,02	0,21±0,04	n.s.

(continuação)

AGL	Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)				Sign.
		0	45	90	135	
C22:5n-3	ER	0,29±0,05	0,22±0,03	0,21±0,03	0,21±0,01	n.s.
	N1	0,22±0,02	0,21±0,04	0,21±0,05	0,17±0,01	n.s.
	N2	0,20±0,01	0,28±0,05	0,20±0,02	0,20±0,01	n.s.
	N3	0,20±0,02	0,22±0,04	0,25±0,03	0,15±0,02	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
	CO	0,21±0,02 ¹	0,31±0,03	0,29±0,02	0,26±0,03	n.s.
	ER	0,33±0,02 ^{b1,2}	0,28±0,03 ^b	0,29±0,01 ^b	0,20±0,01 ^a	**
	N1	0,36±0,04 ²	0,29±0,04	0,32±0,05	0,17±0,00	n.s.
	N2	0,56±0,08 ^{b3}	0,23±0,02 ^a	0,27±0,03 ^a	0,25±0,02 ^a	***
	N3	0,35±0,04 ^{b2}	0,28±0,04 ^{ab}	0,25±0,02 ^{ab}	0,20±0,02 ^a	*
C22:6n-3	Sign.	**	n.s.	n.s.	n.s.	
	CO	0,21±0,02 ^{a1}	0,59±0,10 ^{b2,3}	0,48±0,12 ^{b1}	0,24±0,01 ^{a1}	**
	ER	0,83±0,06 ^{b2,3}	0,26±0,03 ^{a1}	0,56±0,05 ^{b1}	0,23±0,02 ^{a1}	***
	N1	1,12±0,12 ^{b3}	0,22±0,01 ^{a1}	0,21±0,01 ^{a1}	0,16±0,01 ^{a1}	**
	N2	0,67±0,21 ²	0,36±0,09 ^{1,2}	0,48±0,03 ¹	0,58±0,11 ²	n.s.
	N3	0,95±0,03 ^{b2,3}	0,69±0,05 ^{b3}	0,99±0,27 ^{b2}	0,28±0,04 ^{a1}	**
	Sign.	**	*	*	***	
	CO	22,05±3,41 ^{a1}	24,08±1,98 ^a	32,55±2,02 ^{b2}	37,77±4,01 ^{b3}	**
	ER	29,44±1,77 ²	28,49±1,73	31,14±2,10 ²	27,13±1,97 ¹	n.s.
	N1	29,65±1,71 ^{b2}	27,26±1,91 ^b	19,26±2,89 ^{a1}	28,99±1,16 ^{b1,2}	**
AGS	N2	22,84±1,88 ^{a1}	25,07±2,03 ^a	31,91±1,47 ^{b2}	28,64±2,35 ^{ab1,2}	*
	N3	22,34±1,75 ^{a1}	25,99±1,83 ^a	36,27±2,69 ^{b2}	34,76±2,11 ^{b2,3}	***
	Sign.	*	n.s.	**	*	
	CO	21,80±1,87 ^{a1,2}	25,68±3,50 ^a	34,42±1,69 ^b	40,04±3,35 ^{b2}	**
	ER	32,12±2,48 ³	29,15±2,15	30,26±3,29	29,84±3,38 ¹	n.s.
	N1	28,79±1,77 ³	26,05±2,63	31,61±5,02	31,86±2,36 ^{1,2}	n.s.
	N2	26,94±2,39 ^{2,3}	25,75±2,29	33,74±2,40	28,60±3,53 ¹	n.s.
	N3	20,52±1,51 ^{a1}	27,01±2,38 ^a	38,67±2,48 ^b	40,29±2,71 ^{b2}	***
	Sign.	**	n.s.	n.s.	*	
	CO	7,12±0,55 ¹	4,46±0,40	6,21±0,31	3,89±0,26	***
AGPI	ER	8,55±0,85 ^{b2}	5,64±0,77 ^a	4,80±0,66 ^a	3,96±0,17 ^a	***
	N1	6,93±0,54 ^{b1,2}	5,12±0,51 ^{ab}	5,92±1,24 ^b	3,77±0,24 ^a	*
	N2	5,21±0,67 ¹	4,77±0,88	5,59±0,50	3,92±0,46	n.s.
	N3	4,82±0,40 ¹	4,52±0,52	5,77±0,88	4,61±0,24	n.s.
	Sign.	**	n.s.	n.s.	n.s.	
	CO	48,09±2,24 ^{a1,2}	40,38±4,44 ^{a1}	72,81±3,81 ^{b2,3}	86,85±7,40 ^{c3}	***
	ER	69,03±3,31 ⁴	62,43±3,75 ²	59,82±5,96 ^{1,2}	64,10±5,41 ^{1,2}	n.s.
	N1	65,36±3,69 ^{b3,4}	60,04±4,97 ^{ab2}	47,46±5,85 ^{a1}	64,62±3,52 ^{b1,2}	*
	N2	56,37±4,02 ^{2,3}	55,15±5,05 ²	71,32±3,57 ^{2,3}	58,97±6,28 ¹	n.s.
	N3	44,56±3,09 ^{a1}	58,80±6,25 ^{a2}	82,16±5,83 ^{b3}	76,69±4,08 ^{b2,3}	***
AGL Totais	Sign.	***	*	**	*	

(conclusão)

Resultados expressos em mg/g de lipídeos.

Tratamentos: ER = eritorbato de sódio; N1 = Nível de extrato de orégano baseado em equivalência por método de Folin-Ciocalteu; N2 = Nível de extrato de orégano baseado em equivalência por método de DPPH⁺; N3 = Nível de extrato de orégano baseado em equivalência por método de FRAP.

C14:0 – ácido mirístico; C14:1n5 – miristoléico; C15:0 – pentadecanóico; C16:0 – palmítico; C16:1n7 – palmitoléico; C17:0 – heptadecanóico; C17:1n7 - cis-10-heptadecanóico; C18:0 – esteárico; C18:1n9t – eláidico; C18:1n11t - trans-11-vacênico; C18:1n9c – oléico ; C18:1n7c – cis-11-vacênico; C18:2n6t – linoleláidico; C18:2n6c – linoléico; C20:0 – araquídico; C20:1n9 - cis-11-eicosenóico; C18:3n3 – linolênico; C20:2n6 - cis-11,14- eicosadienóico; C22:5n3 – docosapentaenóico; C22:6n3 - cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico;

^{a-d}: Valores médios em mesma linha (correspondente ao mesmo tratamento) não seguidos de mesmas letras diferem significativamente ($P < 0,05$).

¹⁻⁴: Valores médios em mesma coluna (correspondente ao mesmo tempo de armazenamento) não seguidos de mesmas letras diferem significativamente ($P < 0,05$).

Sign.= Significância: *** ($P < 0,001$), ** ($P < 0,01$), * ($P < 0,05$), n.s. não significativo ($P \geq 0,05$) ($n = 6$).

Fonte: Própria autoria.

Os AGL totais são oriundos, em maior porcentagem, de triglicerídeos que constituem a gordura subcutânea (GÓMEZ e LORENZO, 2013). Pode-se observar que o teor médio de AGL aumentou significativamente para os tratamentos CO de 48,09 para 86,85 e para N3, de 44,56 para 76,69 mg/g lipídeo, de zero aos 135 dias ($P < 0,001$), sendo que ao final do armazenamento, estes tratamentos apresentaram valores superiores ($P < 0,05$). Reddy et al. (2013), observou uma tendência similar durante o armazenamento refrigerado aeróbio e a vácuo de produtos reestruturados e cozidos de carneiro contendo extrato de semente de uva e BHA, provavelmente devido à atividade lipolítica microbiana que promove maior geração de ácidos graxos livres.

Aos 135 dias observou-se que ER não diferiu de N1 e N2 ($P < 0,05$), estando de acordo com os resultados obtidos por Aguirrezábal et al. (2000), que avaliaram o efeito de páprica e alho em chorizos, notando que apesar do teor de AGL ter sido crescente em todos os tratamentos durante 96 dias, estes condimentos apresentaram efeito antioxidante tão eficaz quanto aos aditivos sintéticos.

O predominante ácido oléico, apresenta efeito hipolipidêmico e auxilia na redução do colesterol e triacilgliceróis quando substitui gordura saturada na dieta (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2005), indicando benefício ao produto cárneo quanto ao valor nutricional. Apesar de não existir diferença significativa para este ácido graxo livre entre os tratamentos ao final da estocagem, verificou-se que ER não sofreu alterações ao longo do tempo, assim como N1 e N2 ($P > 0,05$).

Conforme pode ser visualizado na Tabela 18, houve aumento ao longo do tempo para as frações de AGS ($P < 0,01$) e AGMI ($P < 0,001$) para CO (respectivamente 71,29 e 55,60%) e N3 (respectivamente 83,67 e 96,34%), assim

como também apresentaram maiores valores aos 135 dias ($P < 0,05$). Entretanto, ao final do armazenamento, não houve diferença significativa para as frações acima mencionadas entre ER, N1 e N2 ($P > 0,05$). Este mesmo comportamento foi verificado em estudos de Macakova et al. (2012), em que compostos flavonóides testados na redução de íons férricos em condições ácidas foram mais eficazes em menores concentrações.

O comportamento similar entre CO e N3 pode ser justificado pela maior lipólise ocorrida resultante da ação de enzimas lipolíticas (ÁLVAREZ et al., 2009; GANDEMER, 2002; LORENZO, GOMÉZ e FONSECA, 2014), já que o sistema enzimático muscular desempenha função relevante na formação dos AGL (LORENZO e CARBALLO, 2015). Além disto, a quantidade do extrato de orégano adicionada pode ter desencadeado efeitos pró-oxidantes, devido às características de seus constituintes (SCHINELLA et al., 2002), apresentando-se ineficiente em concentração mais elevada.

Neste caso, de acordo com características na estrutura química dos compostos fenólicos presentes no extrato, bem como sua dispersão no sistema alimentar, podem ocorrer inúmeras alterações que comprometem sua eficácia (WONG e KITTS, 2002). A redução da capacidade antioxidante após aquecimento é bastante citada para inúmeras espécies vegetais, devido à reação dos compostos fenólicos com substâncias da própria massa cárnea (CHEAH e HASIM, 2000). No entanto, neste estudo, pode-se afirmar que os componentes bioativos remanescentes nos tratamentos N1 e N2 permaneceram estáveis após a etapa de cocção dos produtos cárneos, sendo compatíveis ao tratamento ER.

Níveis mais elevados de ácidos graxos monoinsaturados livres e saturados em relação aos poliinsaturados, provavelmente são devidos à composição lipídica do produto cárneo. Em ovinos, os triglicerídeos são predominantemente constituídos por maior proporção de ácidos graxos saturados em comparação aos insaturados (FERNANDES et al., 2014; MCCARTHY et al., 2001; SINCLAIR, et al., 2007).

Devido a isto, os produtos apresentaram relativamente maiores níveis de ácido palmítico e esteárico (entre 9,23 e 20,54 mg/g lipídeo), sendo que houve aumento significativo para CO ($P < 0,05$) e N3 ($P < 0,01$) durante a estocagem, assim como também maiores teores aos 135 dias, em comparação aos outros tratamentos ($P < 0,05$). Neste caso, a predominância de ácido palmítico pode promover a elevação do colesterol (PENNISI FORELL et al., 2010).

Em geral, as reações oxidativas ocorrem preferencialmente em AGPI (ÁLVAREZ et al., 2009), atuando estes como excelentes substratos para o início da oxidação (GOBERT et al., 2010; IBRAHIM, ABOU-ARAB e SALEM, 2011), principalmente da fração polar de fosfolipídeos, em que há maior proporção destes (DESCALZO e SANCHO, 2008). Assim, observou-se redução em CO ($P < 0,001$), ER ($P < 0,001$) e N1 ($P < 0,05$), respectivamente de 54,63, 46,32 e 54,40%, sendo que apesar da tendência à diminuição, mantiveram-se constantes nos tratamentos N2 e N3 ($P > 0,05$), conforme Figura 31. Este comportamento confirma a maior propensão de AGPI à oxidação (ALFAIA et al., 2010), gerando menos compostos em comparação aos AGS e AGMI, similarmente como constatado por Martín et al. (1999) durante elaboração de presunto. No entanto, ao final do armazenamento, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$), demonstrando a eficácia do antioxidante natural (N2 e N3) em relação ao sintético (ER), já que não houve diferença significativa entre eles ($P > 0,05$), devido a uma lenta oxidação de AGPI, sendo este um importante resultado, já que estes compostos estão associados com inúmeros benefícios à saúde (BOROSKI et al., 2012).

A oxidação de AGPI gera radicais livres que consequentemente reagem com proteínas (GATELLIER et al., 2010), e neste caso, para os tratamentos CO e ER, tendência à maior formação de carbonilas foi notada, conforme anteriormente observado, assim como maior taxa de peróxidos, já que produtos primários também são formados a partir de AGPI (SHAHIDI e ZHONG, 2010). A maior susceptibilidade dos tratamentos CO, ER e N1 pode ser justificada pela baixa eficiência antioxidante, sendo influenciada pela maior liberação de ferro heme, já que carne ovina apresenta alto teor deste metal (PANNIER et al., 2010; PATEIRO et al., 2014).

Além disto, condições de cocção, como por exemplo, tempo e temperatura durante a etapa de cozimento dos produtos cárneos, favorecem a oxidação de ácidos graxos insaturados, mais especificamente poliinsaturados, e consequentemente a produção de radicais livres (DOMÍNGUEZ et al., 2014a; DOMÍNGUEZ et al., 2014b; ESTÉVEZ, 2011). Como a capacidade antioxidante foi menor, o cozimento inicial possivelmente promoveu a desnaturação protéica, sendo que o ferro liberado da mioglobina desnaturada foi responsável por catalisar a reação, promovendo consequentemente a degradação dos compostos antioxidantes presentes, ou de uma porcentagem deles (AHN, GRÜN e FERNANDO, 2002; KULKARNI et al., 2011; WU et al., 2008).

Figura 31 – Evolução de ácidos graxos poliinsaturados livres em linguiça cozida durante o armazenamento (n = 6).

Fonte: Própria autoria.

De acordo com Pannier et al. (2010), a carne ovina representa boa fonte de ômega-3, contribuindo para o fornecimento de nutrientes essenciais para a saúde humana, em relação à carne bovina e suína (IBRAHIM, ABOU-ARAB e SALEM, 2011). Neste caso, doenças crônicas podem ser reduzidas significativamente com a ingestão de maior teor de ácidos graxos essenciais, apesar de seus níveis variarem de acordo com o corte cárneo, fatores genéticos, sistema de produção, alimentação, raça e idade.

Dentre os AGPI, formas importantes de ômega-3 e ômega-6 foram detectadas: docosahexaenóico (C22:6n3 - DHA), docosapentaenóico (DPA), linolênico (C18:3n3) e linoléico (C18:2n6). Observou-se a manutenção e/ou uma tendência à redução destes, sendo que DHA não diferiu significativamente ao longo do armazenamento em N2 ($P > 0,05$), apresentando aos 135 dias valor mais elevado (0,58 mg/g lipídeo) ($P < 0,001$). Em relação ao ER, observou-se comportamento comum para os ácidos graxos essenciais detectados, em que ocorreu redução entre 39,39 e 72,29% durante a estocagem ($P < 0,01$). Entretanto, apesar da tendência à degradação para todos os tratamentos, valores de linoléico e linolênico foram mantidos durante o período para N3 (respectivamente de 2,87-3,03 e 0,58-0,64 mg/g

lipídeo), sugerindo uma oxidação mais lenta para estes ácidos, já que para DHA e DPA este sofreu diminuição (respectivamente de 0,95-0,28 e 0,35-0,20 mg/g lipídeo) ($P < 0,05$). Gawlik-Dziki (2012) em estudos envolvendo atividade antioxidante de especiarias e a influência destas na atividade de enzimas peroxidase e pró-oxidantes, confirmou que o extrato de orégano e alecrim foram os mais eficientes na manutenção do ácido linoléico, o que consequentemente melhora o sistema antioxidante enzimático e não enzimático, devido às propriedades anti-inflamatórias. Neste caso, este ácido age favoravelmente no perfil lipídico sanguíneo sendo capaz de reduzir riscos de doenças cardíacas coronárias e de diabetes tipo 2 (PENNISI FORELL et al., 2010).

De acordo com perfil de ácidos graxos livres totais apresentados, notou-se que os tratamentos N2 e N3 apresentaram resultados satisfatórios em relação ao produto tradicional (ER), assim como verificado em estudos de Berasategi et al. (2011), a partir da elaboração de mortadela enriquecida com Ω -3 utilizando extrato de *Melissa officinalis*, demonstrando resultados equivalentes ao BHA. Porém, com relação aos valores das frações de ácidos graxos totais, pode-se confirmar que N2 foi o tratamento mais promissor devido à compatibilidade ao ER, sendo que para AGS e AGMI não diferiram entre si aos 135 dias, e além disto, para AGPI não apresentou redução ao longo do tempo e nem diferenças quanto ao ER ($P > 0,05$), mesmo que este composto sintético apresentou grande susceptibilidade oxidativa durante a estocagem ($P < 0,001$).

3.5.7 Perfil de compostos voláteis

Um total de 14 compostos voláteis foram identificados e quantificados nos produtos cárneos avaliados, dentre eles, 1 cetona, 3 aldeídos, 4 alcanos, 1 éster e 5 hidrocarbonetos, conforme pode ser visualizado na Tabela 19.

Tabela 19 – Compostos voláteis de linguiça cozida durante armazenamento (média±erro padrão). *(continua)*

Compostos voláteis	IRL	Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)				Sign.
			0	45	90	135	
<i>Cetona</i> 3-hidroxi-2-butanona	664	CO	0,00±0,00 ^a	24,56±5,79 ^{b2}	56,97±7,06 ^{c2}	53,48±2,58 ^{c2}	***
		ER	0,00±0,00 ^a	64,79±6,51 ^{b4}	216,95±6,54 ^{d4}	162,99±4,90 ^{c3}	***
		N1	0,00±0,00 ^a	12,62±2,88 ^{b1,2}	191,12±7,51 ^{d3}	41,87±3,17 ^{c1}	***
		N2	0,00±0,00 ^a	38,63±3,63 ^{b3}	200,83±7,06 ^{c3,4}	207,72±2,90 ^{c4}	***
		N3	0,00±0,00 ^a	4,24±1,76 ^{a1}	0,00±0,00 ^{a1}	38,58±5,19 ^{b1}	***
		Sign.	n.s.	***	***	***	
<i>Aldeídos</i> Pentanal	707	CO	30,09±4,88 ^{b3,4}	1,65±0,28 ^a	2,94±1,04 ^{a1}	3,16±0,80 ^{a1}	***
		ER	17,93±3,20 ^{b2}	3,31±0,52 ^a	1,98±0,10 ^{a1}	2,22±0,72 ^{a1}	***
		N1	35,37±4,45 ^{b4}	7,03±1,26 ^a	7,18±1,47 ^{a1}	8,94±1,07 ^{a2}	***
		N2	0,00±0,00 ^{a1}	6,29±1,90 ^b	8,18±1,25 ^{b1}	12,97±0,79 ^{c3}	***
		N3	22,39±3,76 ^{b2,3}	7,11±2,14 ^a	20,06±2,29 ^{b2}	10,86±0,88 ^{a2,3}	**
		Sign.	***	n.s.	***	***	
Hexanal	860	CO	17,77±3,91 ^{a2}	8,45±0,32 ^{a1}	30,75±6,89 ^{b2}	12,34±1,10 ^{a1}	**
		ER	14,27±1,23 ²	8,28±1,67 ¹	11,70±1,84 ¹	10,84±0,94 ¹	n.s.
		N1	16,80±0,85 ²	14,70±1,08 ²	16,10±2,68 ^{1,2}	20,47±1,01 ²	n.s.
		N2	5,12±2,28 ^{a1}	15,57±1,10 ^{b2}	20,07±2,68 ^{b1,2}	19,59±1,91 ^{b2}	**
		N3	15,70±1,09 ^{a2}	15,71±0,44 ^{a2}	112,57±13,10 ^{b3}	26,66±1,97 ^{a3}	***
		Sign.	**	***	***	***	
Heptanal	977	CO	30,67±3,45 ^{c3}	6,19±0,55 ^a	12,27±1,90 ^{b2}	4,37±0,13 ^{a1}	***
		ER	7,23±1,36 ^{b1,2}	6,48±0,81 ^{ab}	4,75±0,79 ^{ab1}	4,02±0,46 ^{a1}	*
		N1	10,01±1,60 ^{b2}	6,66±0,59 ^{ab}	3,89±0,42 ^{a1}	6,60±0,98 ^{ab2,3}	*
		N2	3,28±0,80 ^{a1}	8,76±0,32 ^c	6,32±1,25 ^{b1}	5,79±0,64 ^{b1,2}	**
		N3	7,01±0,86 ^{a1,2}	6,39±0,83 ^a	52,29±2,93 ^{b3}	8,23±0,95 ^{a3}	***
		Sign.	***	n.s.	***	**	
<i>Alcanos</i> Nonano	921	CO	0,00±0,00 ^a	5,63±0,66 ^b	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	***
		ER	0,00±0,00 ^a	5,42±0,70 ^b	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	***
		N1	0,00±0,00 ^a	4,98±0,98 ^b	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	***
		N2	0,00±0,00 ^a	5,72±0,92 ^b	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	***
		N3	0,00±0,00 ^a	3,71±0,39 ^b	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	***
		Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
3-metil-nonano	1009	CO	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^{a1}	3,62±0,68 ^b	3,45±0,34 ^{b1}	***
		ER	0,00±0,00 ^a	3,29±0,48 ^{b2}	3,86±0,41 ^b	3,70±0,45 ^{b1}	***
		N1	0,00±0,00 ^a	3,09±0,49 ^{b2}	3,38±0,59 ^b	5,05±0,43 ^{c2}	***
		N2	0,00±0,00 ^a	3,44±0,11 ^{b2}	3,35±0,38 ^b	3,29±0,28 ^{b1}	***
		N3	0,00±0,00 ^a	2,37±0,23 ^{b2}	4,68±0,60 ^d	3,57±0,26 ^{c1}	***
		Sign.	n.s.	***	n.s.	*	
Decano	1036	CO	0,00±0,00 ^a	7,29±0,74 ^{c1,2}	4,82±0,86 ^b	5,39±0,29 ^b	***
		ER	0,00±0,00 ^a	7,41±0,77 ^{c1,2}	4,70±0,64 ^b	5,47±0,66 ^b	***
		N1	0,00±0,00 ^a	6,97±0,63 ^{b1,2}	5,62±0,84 ^b	6,77±0,44 ^b	***
		N2	0,00±0,00 ^a	9,03±0,80 ^{c2}	4,49±0,64 ^b	5,95±0,65 ^b	***

(continuação)

Compostos voláteis	IRL	Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)				Sign.
			0	45	90	135	
Dodecano	1206	N3	0,00±0,00 ^a	5,22±0,30 ^{b1}	5,68±0,47 ^b	6,21±0,59 ^b	***
		Sign.	n.s.	*	n.s.	n.s.	
		CO	3,31±0,34 ^a	5,61±0,90 ^b	2,85±0,50 ^a	2,85±0,29 ^{a1}	**
		ER	4,29±0,60	4,51±0,40	3,54±0,36	3,14±0,36 ¹	n.s.
		N1	4,17±0,41 ^a	5,81±0,34 ^b	3,96±0,62 ^a	4,46±0,41 ^{ab2}	*
		N2	3,17±0,86 ^a	6,67±0,65 ^b	4,45±0,70 ^a	3,23±0,25 ^{a1}	**
		N3	2,71±0,52 ^a	5,74±0,72 ^c	4,86±0,62 ^{bc}	3,58±0,23 ^{ab1,2}	**
Éster Ácido nonanóico	1318	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	*	
		CO	2,19±0,40 ^{b3}	0,00±0,00 ^{a1}	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	***
		ER	1,29±0,38 ^{b2}	0,00±0,00 ^{a1}	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	***
		N1	1,63±0,27 ^{c2,3}	0,80±0,07 ^{b2}	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	***
		N2	0,00±0,00 ¹	0,00±0,00 ¹	0,00±0,00	0,00±0,00	n.s.
		N3	1,54±0,09 ^{c2,3}	0,87±0,10 ^{b2}	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	***
		Sign.	***	***	n.s.	n.s.	
Hidrocarbonetos Octano	696	CO	4,20±0,34 ^{a3}	5,16±0,44 ^a	9,62±0,65 ^{c2,3}	7,32±1,07 ^{b2}	***
		ER	1,94±0,40 ^{b2}	5,29±0,40 ^c	0,00±0,00 ^{a1}	0,00±0,00 ^{a1}	***
		N1	3,50±0,36 ^{a3}	6,15±0,54 ^b	8,27±1,47 ^{b2}	12,05±0,94 ^{c3}	***
		N2	0,00±0,00 ^{a1}	6,37±0,83 ^b	0,00±0,00 ^{a1}	9,07±0,62 ^{c2}	***
		N3	2,47±0,60 ^{a2}	5,91±0,21 ^b	10,34±1,08 ^{c3}	11,82±0,57 ^{c3}	***
		Sign.	***	n.s.	***	***	
		CO	9,44±1,45 ^{b3}	0,00±0,00 ^a	1,00±0,26 ^{a2}	1,11±0,22 ^{a2}	***
2,3,4-trimetil- pentano	737	ER	8,45±1,37 ^{b2,3}	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^{a1}	0,00±0,00 ^{a1}	***
		N1	7,09±0,55 ^{b2,3}	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^{a1}	0,00±0,00 ^{a1}	***
		N2	0,00±0,00 ¹	0,00±0,00	0,00±0,00 ¹	0,00±0,00 ¹	n.s.
		N3	6,54±0,30 ^{b2}	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^{a1}	0,00±0,00 ^{a1}	***
		Sign.	***	n.s.	***	***	
		CO	0,92±0,07 ^{a2}	3,26±0,40 ^{b2}	7,44±0,83 ^d	5,63±0,38 ^{c1}	***
		ER	0,00±0,00 ^{a1}	3,68±0,40 ^{b2}	5,23±1,09 ^{bc}	6,43±0,60 ^{c1}	***
3-etil-heptano	868	N1	1,02±0,24 ^{a2}	2,76±0,32 ^{a1,2}	6,06±1,00 ^b	8,99±0,91 ^{c2}	***
		N2	0,00±0,00 ^{a1}	3,76±0,23 ^{b2}	5,50±0,88 ^b	5,68±1,06 ^{b1}	***
		N3	0,00±0,00 ^{a1}	1,95±0,14 ^{ab1}	6,11±1,14 ^c	4,00±0,97 ^{bc1}	***
		Sign.	***	**	n.s.	**	
		CO	0,00±0,00 ^a	2,98±0,46 ^c	1,42±0,52 ^{b2}	1,66±0,32 ^{b2}	***
		ER	0,00±0,00 ^a	2,42±0,27 ^b	0,00±0,00 ^{a1}	0,00±0,00 ^{a1}	***
		N1	0,00±0,00 ^a	2,37±0,24 ^b	0,00±0,00 ^{a1}	0,00±0,00 ^{a1}	***
Undecano	1121	N2	0,00±0,00 ^a	2,85±0,31 ^b	0,00±0,00 ^{a1}	0,00±0,00 ^{a1}	***
		N3	0,00±0,00 ^a	2,07±0,13 ^b	0,00±0,00 ^{a1}	0,00±0,00 ^{a1}	***
		Sign.	n.s.	n.s.	***	***	
		CO	4,34±0,80 ^{b2}	5,53±0,81 ^b	2,03±0,52 ^a	2,05±0,26 ^a	**
		ER	5,36±2,85 ^{b2}	5,15±0,45 ^b	2,80±0,42 ^{ab}	2,38±0,49 ^a	*
		N1	3,85±0,72 ^{a2}	6,10±0,40 ^b	3,63±0,59 ^a	2,75±0,49 ^a	**
		N2	0,00±0,00 ^{a1}	6,25±0,52 ^c	3,87±0,97 ^b	2,47±0,05 ^b	**
Tridecano	1282						

(conclusão)

Compostos voláteis	IRL	Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)				Sign.
			0	45	90	135	
Voláteis totais		N3	3,16±0,72 ^{a2}	6,55±0,70 ^b	4,28±0,72 ^a	3,21±0,31 ^a	**
		Sign.	**	n.s.	n.s.	n.s.	
		CO	80,94±5,55 ^{b4}	76,51±8,48 ^{a2,3}	92,31±5,57 ^{b3}	96,51±2,71 ^{b2}	n.s.
		ER	47,26±4,34 ^{a2}	50,00±8,72 ^{a1}	243,06±6,18 ^{c4}	198,13±2,91 ^{b3}	***
		N1	75,73±5,78 ^{b3,4}	60,49±4,47 ^{ab1,2}	47,47±4,87 ^{a1,2}	113,13±10,98 ^{c2}	***
		N2	4,97±0,61 ^{a1}	89,85±4,85 ^{c3}	63,29±4,04 ^{b2}	50,44±11,05 ^{b1}	***
		N3	59,38±6,95 ^{a2,3}	58,86±3,95 ^{a1,2}	43,02±2,29 ^{a1}	114,28±11,90 ^{b2}	***
		Sign.	***	**	***	***	

Resultados expressos em UA × 10⁶/g de amostra.

UA – unidades de área resultante da contagem cromatográfica iônica.

IRL: índices de Retenção Linear calculados em relação ao tempo de retenção do n-alceno (C₅–C₁₉).

Tratamentos: ER = eritorbato de sódio; N1 = Nível de extrato de orégano baseado em equivalência por método de Folin-Ciocalteu; N2 = Nível de extrato de orégano baseado em equivalência por método de DPPH; N3 = Nível de extrato de orégano baseado em equivalência por método de FRAP.

^{a-d}: Valores médios em mesma linha (correspondente ao mesmo tratamento) não seguidos de mesmas letras diferem significativamente (P<0,05).

¹⁻⁴: Valores médios em mesma coluna (correspondente ao mesmo tempo de armazenamento) não seguidos de mesmas letras diferem significativamente (P<0,05).

Sign.= Significância: *** (P<0,001), ** (P<0,01), * (P<0,05), n.s. não significativo (P≥0,05) (n = 6).

Fonte: Própria autoria.

Durante o período de armazenamento, observou-se que em todos os tratamentos houve o aumento de compostos voláteis totais de oxidação lipídica (P<0,001), exceto para CO, em que não houve diferença significativa (P>0,05), provavelmente porque os compostos voláteis foram formados e liberados previamente e mais rapidamente em relação aos outros tratamentos, já que não continha antioxidantes.

Aos 135 dias, uma quantidade significativamente maior (P<0,001) de compostos voláteis totais foi encontrada em ER (P<0,001) apresentando valor de 198,13 UA×10⁶/g de amostra, enquanto que N2 apresentou menor valor (50,44 UA×10⁶/g de amostra) (P<0,001). Além disto, N3 não diferiu do tratamento sem adição de antioxidantes (96,51 vs 114,28 UA×10⁶/g de amostra). Estes resultados indicaram que a adição de extrato em nível intermediário (N2) melhorou o controle da oxidação lipídica, sugerindo a provável influência da concentração do extrato de orégano na maior formação destes compostos, concordando com resultados de AGL, conforme já discutidos anteriormente.

Tendência semelhante foi encontrada por Cando et al. (2014), que notaram um efeito pró-oxidante em concentração mais elevada de extrato (*Epilobium hirsutum* L.) que intensificou a carbonilação de proteínas, apresentando resultados

superiores a produto cárneo cozido, sem adição de antioxidantes. Neste caso, os mesmos autores afirmam que o cozimento degrada mioglobina e promove a ruptura dos tecidos que favorecem a liberação de ferro e compostos pró-oxidantes, naturalmente presentes nos tecidos musculares, aumentando a incorporação de oxigênio no sistema cárneo e consequentemente o potencial pró-oxidante.

Observando-se os compostos voláteis formados, a família química mais relevante foi o da cetona, em que ao final da estocagem, maiores valores foram apresentados pelo tratamento N2, sendo notada maior formação de compostos entre 90 e 135 dias. Para ER e N1, valores máximos foram observados aos 90 dias, enquanto que N3 apresentou baixo valor ao final do armazenamento, possivelmente devido ao seu esgotamento mais rápido, assim como ocorrido para CO.

Seguidamente à cetona, os aldeídos, principais indicadores da oxidação lipídica (ANSORENA et al., 1998; SHAHIDI e ZHONG, 2010) e derivados da oxidação de ácidos graxos insaturados (PALEARI et al., 2006) foram considerados os compostos voláteis dominantes, incluindo hexanal, heptanal e pentanal, que ao final da estocagem apresentaram maiores teores em tratamentos contendo extrato de orégano ($P < 0,01$).

Aos 135 dias, o principal produto da degradação do ácido linoléico, o hexanal (MARTÍN et al., 2000; SHAHIDI e PEGG, 1994), foi o composto mais abundante em N3 ($P < 0,001$), contendo $26,66 \text{ UAx}10^6/\text{g}$ de amostra, apresentando valor máximo, e mais elevado, aos 90 dias de armazenamento ($112,57 \text{ UAx}10^6/\text{g}$ de amostra) ($P < 0,001$), assim como em CO ($30,75 \text{ UAx}10^6/\text{g}$ de amostra). Ao final da estocagem, N1 e N2 não diferiram entre si, porém apresentaram valores superiores em relação ao ER ($P < 0,001$), que não apresentou variações durante o armazenamento, similarmente ao N1 ($P > 0,05$). Quanto ao heptanal, N2 não diferiu de ER aos 135 dias de estocagem, apesar de apresentarem, respectivamente, aumento ($P < 0,01$) e redução ($P < 0,05$) ao longo do período avaliado. Inicialmente CO apresentou nível máximo do composto ($P < 0,001$), enquanto que aos 90 dias observou-se a maior liberação para N3 ($P < 0,001$). Já para pentanal, N2 não diferiu de N3 ($P > 0,05$) e ER apresentou menor valor aos 135 dias em comparação aos produtos contendo antioxidante natural ($P < 0,001$), não diferindo de CO, sendo que este apresentou maior formação do composto no tempo zero ($P < 0,001$).

Neste caso, o tratamento térmico, pelo qual os produtos cárneos foram submetidos durante a elaboração, possivelmente intensificou a reação do produto

cárneo com constituintes do extrato de orégano desencadeando maior oxidação de ácidos graxos insaturados que consequentemente aumentaram a formação dos radicais livres, favorecendo o ataque aos outros ácidos graxos, e, consequentemente, gerando compostos voláteis e mais especificamente, aldeídos (ELMORE et al., 1999; NIETO, BAÑÓN e GARRIDO, 2011).

4 CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos, o extrato de orégano mostrou um potencial antioxidante equivalente ao eritorbato de sódio em níveis intermediários e altos (N2 e N3), calculados a partir dos métodos de DPPH[•] e FRAP, não comprometendo a maioria dos parâmetros físico-químicas e sensoriais avaliados, apresentando grandes vantagens que permitem a substituição de antioxidantes sintéticos oferecendo aos produtos cárneos cozidos uma maior saudabilidade e melhorias na qualidade nutricional e sensorial.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRREZÁBAL, M.M. et al. The effect of paprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. **Meat Science**, v.54, p.77-81, 2000.

AHN, J.; GRÜN, I.U.; FERNANDO, L.N. Antioxidant properties of natural plant extracts containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. **Journal of Food Science**, v.67, p.1364-1369, 2002.

AHN, J.; GRÜN, I.U.; MUSTAPHA, A. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. **Food Microbiology**, v.24, p.7–14, 2007.

AKARPAT, A.; TURHAN, S.; USTUN, N.S. Effects of hot-water extracts from myrtle, rosemary, nettle and lemon balm leaves on lipid oxidation and color of beef patties

during frozen storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.32, p.117–132, 2008.

ALFAIA, C.P.M. et al. Effect of cooking methods on fatty acids, conjugated isomers of linoleic acid and nutritional quality of beef intramuscular fat. **Meat Science**, v.84, p.769-777, 2010.

ALESON-CARBONELL, L. et al. Characteristics of beef burger as influenced by various types of lemon albedo. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.6, p.247-255, 2005.

ÁLVAREZ, I. et al. Changes in the fatty acid composition of m. Longissimus dorsi of lamb during storage in a high-oxygen modified atmosphere at different levels of dietary vitamin e supplementation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.140-146, 2009.

ANSORENA, D. et al. Addition of Palatase M (lipase from *Rhizomucor miehei*) to dry fermented sausages: Effect over lipolysis and study of the further oxidation process by GC–MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3244-3248, 1998.

A.O.C.S. Official Procedure, Approved Procedure Am 5-04, **Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction**. American Oil Chemists' Society, Urbana, IL (2005).

BAGCHI, D. et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. **Toxicology**, v.148, n.2, p. 187-197, 2000.

BAÑÓN, S. et al. Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. **Meat Science**, v.77, p.626-633, 2007.

BERASATEGI, I. et al. High in omega-3 fatty acids" bologna-type sausages stabilized with an aqueous-ethanol extract of *Melissa officinalis*. **Meat Science**, v.88, p.705-711, 2011.

BERASATEGI, I. et al. Healthy reduced-fat Bologna sausages enriched in ALA and DHA and stabilized with *Melissa officinalis* extract. **Meat Science**, v.96, 1185-1190, 2014.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extration and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

BOURNE, M.C. Texture profile analysis. **Food Technology**, v.32, p.62–66, 1978.
BOROSKI, M. et al. Use of oregano extract and oregano essential oil as antioxidants in functional dairy beverage formulations. **LWT - Food Science and Technology**, v.47, p.167-174, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Métodos Analíticos para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes – LANARA. Brasília, 1989.

BRASIL. Instrução Normativa n.º 04, de 31 de Março de 2000. Dispõe sobre os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de linguiça. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília-DF, mar. 2000.

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

CAMPO, M.M. et al. Flavour perception of oxidation in beef. **Meat Science**, v.72, p.303-311, 2006.

CANDO, D. et al. Phenolic-rich extracts from Willowherb (*Epilobium hirsutum* L.) inhibit lipid oxidation but accelerate protein carbonylation and discoloration of beef patties. **European Food Research and Technology**, v.238, p.741-751, 2014.

CARPENTER, R. et al. Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork. **Meat Science**, v.76, p.604–610, 2007.

CHAN, K.W. et al. Cinnamon bark deodorised aqueous extract as potential natural antioxidant in meat emulsion system: a comparative study with synthetic and natural food antioxidants. **Journal of Food Science and Technology**, v.51, p.3269–3276, 2014.

CHEAH, P.B.; HASIM, N.H.A. Natural antioxidant extract from galangal (*Alpinia galanga*) for minced beef. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1565-1571, 2000.

CIE (1978). International commission on illumination, recommendations on uniform colour spaces, colour difference equations, psychometric colour terms. Supplement no. 15 to CIE publication no. 15 (E-1.3.1) 1971/(TO-1.3) Paris, France: Bureau Central de la CIE.

COLINDRES, P.; BREWER, M.S. Oxidative stability of cooked, frozen, reheated beef patties: Effect of antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, p.963-968, 2011.

DANILA, A.O.; GATEA, F.; RADU, G.L. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs. **Chemistry of Natural Compounds**, v.47, p.21-26, 2011.

DESCALZO, A.M.; SANCHO, A.M. A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. **Meat Science**, v.79, p.423-436, 2008.

DOMÍNGUEZ, R. et al. Effect of different cooking methods on lipid oxidation and formation of volatile compounds in foal meat. **Meat Science**, 97, 223-230, 2014a.

DOMÍNGUEZ, R. et al. Influence of thermal treatment on formation of volatile compounds, cooking loss and lipid oxidation in foal meat. **LWT - Food Science and Technology**, v.58, p.439-445, 2014b.

DOMÍNGUEZ, R., LORENZO, J.M. Effect of genotype on fatty acid composition of intramuscular and subcutaneous fat of Celta pig breed. **Grasas y Aceites**, v.65, p.1-11, 2014.

DORMAN, H.J.D. et al. Characterisation of the antioxidant properties of deodourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, v.83, p.255-262, 2003.

ELMORE, J.D. et al. Effect of polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1619-1625, 1999.

ESTÉVEZ, M. Protein carbonyls in meat systems: A review. **Meat Science**, v.89, p.259-279, 2011.

ESTÉVEZ, M.; CAVA, R. Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of live pâté. **Meat Science**, v.68, p.551-558, 2004.

ESTÉVEZ, M.; VENTANAS, S.; CAVA, R. Effect of natural and synthetic antioxidants on protein oxidation and colour and texture changes in refrigerated stored porcine liver paté. **Meat Science**, v.74, p.396-403, 2006.

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

FERNANDES, R.P.P. et al. Stability of lamb loin stored under refrigeration and packed in different modified atmosphere packaging systems. **Meat Science**, v.96, p.554-561, 2014.

FERNÁNDEZ-GINÉS, J.M. et al. Lemon albedo as a new source of dietary fiber: Application to bologna sausages. **Meat Science**, v.67, p.7-13, 2004.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. et al. Evaluation of the antioxidant potential of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in cooked pork meat. **Journal of Food Science**, v.68, p.660-664, 2006.

GARCÍA-REGUEIRO, J.A.; GILBERT, J.; DÍAZ, I. Determination of neutral lipids from subcutaneous fat of cured ham by capillary gas chromatography and liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.667, p.225-233, 1994.

GAWLIK-DZIKI, U. Dietary spices as a natural effectors of lipoxygenase, xanthine oxidase, peroxidase and antioxidant agents. **LWT - Food Science and Technology**, v.47, p.138-146, 2012.

GANDEMER, G. Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. **Meat Science**, v.62, p.309-321, 2002.

GATELLIER, P. Effect of cooking on protein oxidation in n-3 polyunsaturated fatty acids enriched beef. Implication on nutritional quality. **Meat Science**, v.85, p.645-650, 2010.

GEORGANTELIS, D. et al. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. **Meat Science**, v.75, p.256-264, 2007.

GOBERT, M. et al. Plant extracts combined with vitamin E in PUFA-rich diets of cull cows protect processed beef against lipid oxidation. **Meat Science**, v.85, p.676-683, 2010.

GÓMEZ, M.; LORENZO, J.M. Effect of fat level on physicochemical, volatile compounds and sensory characteristics of dry-ripened “chorizo” from Celta pig breed. **Meat Science**, v.95, n.3, p.658-666, 2013.

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**, v.81, p.410-417, 2009.

HORWITZ, W.; LATIMER, G.W. **Association of Official Analytical Chemistry—AOAC Official Methods of Analysis** (18th ed.). Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists-AOAC International, 2007.

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

HUNT, M.C. et al. **Guidelines for meat color evaluation**. American Meat Science Association, Kansas State University: Manhattan, KS, 1991. p.1-17.

IBRAHIM, H.M.; ABOU-ARAB, A.A.; ABU SALEM, F.M. Antioxidant and antimicrobial effects of some natural plant extracts added to lamb patties during storage. **Grasas y Aceites**, v.62, p.139-148, 2011.

ISO (International Organization for Standardization) (1978). Determination of nitrogen content, ISO 937:1978 standard. International standards meat and meat products. Genève, Switzerland: International Organization for Standardization.

ISO (International Organization for Standardization) (1997). Meat and meat products - Determination of moisture content, ISO 1442:1997 standard. International standards meat and meat products. Genève, Switzerland: International Organization for Standardization.

ISO (International Organization for Standardization) (1998). Determination of ash content, ISO 936:1998 standard. International standards meat and meat products. Genève, Switzerland: International Organization for Standardization.

ISO (International Organization for Standardization) (2007). Sensory analysis - General guidance for the design of test rooms, ISO 8589:2007 standard. Genève, Switzerland: International Organization for Standardization.

JIA, N. et al. Antioxidant activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on lipid and protein oxidation of pork patties during chilled storage. **Meat Science**, v.91, n.4, p.533-539, 2012.

KALUZNY, M.A. et al. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. **Journal of Lipid Research**, v.26, p.135-140, 1985.

KIM, H-W. et al. Antioxidant effects of soy sauce on color stability and lipid oxidation of raw beef patties during cold storage. **Meat Science**, v.95, p.641-646, 2013.

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

KOSAR, M.; DORMAN, H.D.J.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristic of extracts from selected *Lamiaceae* species. **Food Chemistry**, v.91, p.525-533, 2005.

KRISHNAN, R.K. et al. Bio protection and preservation of raw beef meat using pungent aromatic plant substances. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.94, n.12, p.2456-2463, 2014a.

KRISHNAN, R.K. et al. Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.171, p.32-40, 2014b.

KULKARNI, S. et al. Effect of grape seed extract on oxidative, color and sensory stability of a pre-cooked, frozen, re-heated beef sausage model system. **Meat Science**, v.88, p.139-144, 2011.

LAGOURI, V.; NISTEROPOULOU, E. Antioxidant properties of *O. Onites*, *T. vulgaris* and *O. basilicum* species grown in Greece and their total phenol and rosmarinic acid content. **Journal of Food Lipids**, v.16, p.484-498, 2009.

LORENZO, J.M.; GÓMEZ, M.; FONSECA, S. Effect of commercial starter cultures on physicochemical characteristics, microbial counts and free fatty acid composition of dry-cured foal sausage. **Food Control**, v.46, p.382-389, 2014.

LORENZO, J.M.; CARBALLO, J. Changes in physico-chemical properties and volatile compounds throughout the manufacturing process of dry-cured foal loin. **Meat Science**, v.99, p.44-51, 2015.

LUCIANO, G. et al. Lipid and colour stability of meat from lambs fed fresh herbage or concentrate. **Meat Science**, v.82, p.193-199, 2009.

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

MACAKOVA, K. et al. Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. **Food Chemistry**, v.135, p.2584-2592, 2012.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 11.ed. São Paulo: ROCA, 2005. 1179p.

MARTÍN, L. et al. Evolution of volatile aldehydes in Iberian Ham matured under different processing conditions. **Meat Science**, v.54, p.333-337, 2000.

MATHEW, S.; ABRAHAM, E.T. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (cinnamomum verum) bark extracts, through various in vitro models. **Food Chemistry**, 94, p.520-528, 2006.

McBRIDE, N.T.M.; HOGAN, S.A.; KERRY, J.P. Comparative addition of rosemary extract and additives on sensory and antioxidant properties of retail packaged beef. **International Journal of Food Science and Technology**, v.42, p.1201-1207, 2007.

MACFIE, H.J. et al. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. **Journal of Sensory Studies**, v.4, p.129-148, 1989.

MEILGAARD, M.C.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory Evaluation Techniques**. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 448p.

MIRON, T.L. et al. Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p.4918-4927, 2011.

MURIEL, E. et al. Lipolytic and oxidative changes in Iberian dry-cured loin. **Meat Science**, v.99, p.44-51, 2007.

NAVEENA, B.M. et al. Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. **Meat Science**, v.80, p.304-308, 2008.

NIETO, G., BAÑÓN, S., GARRIDO, M.D. Effect of supplementing ewes' diet with thyme (*Thymus zygis* ssp. *gracilis*) leaves on the lipid oxidation of cooked lamb meat. **Food Chemistry**, v.125, p.1147-1152, 2011.

NUNEZ DE GONZALEZ, M.T. et al. Antioxidant properties of dried plum ingredients in raw and precooked pork sausage. **Journal of Food Science**, v.73, p.H63-H71, 2008.

OLIVER, C.N. et al. Aged-related changes in oxidized proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.5488-5491, 1987.

OZVURAL, E.B.; VURAL, H. The effects of grape seed extract on quality characteristics of frankfurters. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.36, p.291-297, 2012.

OZTURK, M. et al. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. **Food Chemistry**, v.103, p.623-630, 2007.

PATEIRO, M. et al. Effect of addition of green tea, chestnut and grape extract on the shelf-life of pig liver pâté. **Food Chemistry**, v.147, p.386-394, 2014.

PALEARI, M.A. et al. Characterization of a lamb ham: fatty acids and volatile compounds composition. **Journal of Muscle Foods**, v.17, p.398-412, 2006.

PANNIER, L. et al. Prime Australian lamb supplies key nutrients for human health. **Animal Production Science**, v.50, p.1115-1122, 2010.

PENNISI FORELL, S.C. et al. Effect of type of emulsifiers and antioxidants on oxidative stability, colour and fatty acid profile of low-fat beef burgers enriched with unsaturated fatty acids and phytosterols. **Meat Science**, v.86, n.2, p.364-370, 2010.

PURRIÑOS, L. et al. Development of volatile compounds during the manufacture of dry-cured "lacón" a Spanish traditional meat product. **Journal of Food Science**, v.76, p.C89-C97, 2011.

QI, S.; HUA, H.; HUANG, J.; WANG, Q.; WEI, Q. Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) seed water extract as potential antioxidant and anti-obese natural additive in meat products. **Food Control**, v.50, p.195-201, 2015.

RECORD, I.R.; LANE, J.M. Simulated intestinal digestion of green and black teas. **Food Chemistry**, v.73, p.481-486, 2001.

REDDY, G.V.B. et al. Effects of grape seed extract on the oxidative and microbial stability of restructured mutton slices. **Meat Science**, v.95, p.288-294, 2013.

RENERRE, M. Review: biochemical basis of fresh meat color. **In:** Proceedings of the 45th international congress of meat science and technology. Yokohama, Japan, 2000. p.344-352.

RIPOLL, G. et al. Instrumental meat quality of veal calves reared under three management systems and color evolution of meat stored in three packaging systems. **Meat Science**, 93 336-343, 2013.

RODRÍGUEZ VAQUERO, M.J. et al. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. **Food Control**, v.21, p.779-785, 2010.

ROLDAN, M. et al. Effect of different temperature–time combinations on lipid and protein oxidation of sous-vide cooked lamb loins. **Food Chemistry**, v.149, p.129-136, 2014.

SAKATA, R. Studies of physicochemical characteristics of red pigments in meat products. **Animal Science Journal**, v.71, p.1-16, 2000.

SCHINELLA, G.R. et al. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. **Life Sciences**, v.70, p.1023-1033, 2002.

SHAHIDI, F.; PEGG, R.B. Hexanal as an indicator of the flavor deterioration of meat and meat products. **ACS Symposium Series**, v.558, p.256-279, 1994.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, v.39, p.4067-4079, 2010.

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

SHAH, M.A.; BOSCO, S.J.D.; MIR, S.A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. **Meat Science**, v.98, p.21-33, 2014.

SHEHATA, A.J.; DE MAN, J.M.; ALEXANDER, J.C. A simple and rapid method for the preparation of methyl esters of fats in milligram amounts for gas chromatography. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.3, p.85-89, 1970.

SINCLAIR, L.A. Nutritional manipulation of the fatty acid composition of sheep meat: a review. **Journal of Agricultural Science**, v.145, p.419-434, 2007.

SOTO, E. et al. Impact of feeding and rearing systems of Iberian pigs on volatile profile and sensory characteristics of dry-cured loin. **Meat Science**, v.79, p.666–676, 2008.

SPIRIDON, I.; BODIRLAU, R.; TEACA, C.-A. Total phenolic content and antioxidant activity of plants used in traditional Romanian herbal medicine. **Central European Journal of Biology**, v.6, p. 388-396, 2011.

TAYEL, A.A.; EL-TRAS, W.F. Plant extracts as potent biopreservatives for *Salmonella typhimurium* control and quality enhancement in ground beef. **Journal of Food Safety**, v.32, p.115-121, 2012.

TORNBERG, E. Effect of heat on meat proteins e implications on structure and quality of meat products: a review. **Meat Science**, v.70, p.493-508, 2005.

TRINDADE, R.A.; MANCINI-FILHO, J.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H. Natural antioxidants protecting irradiated beef burgers from lipid oxidation. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.98-104, 2010.

TUSEVSKI, O. et al. Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. **Central European Journal of Biology**, v.9, p.888-900, 2014.

VILLAYERDE, A.; VENTANAS, J.; ESTÉVEZ, M. Nitrite promotes protein carbonylation and strecker aldehyde formation in experimental fermented sausages: are both events connected?. **Meat Science**, v.98, p.665–672, 2014.

VUORELA, S. et al. Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.8492-8497, 2005.

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

WONG, P.Y.Y., KITTS, D.D. The effects of herbal pre-seasoning on microbial and oxidative changes in irradiated beef steaks. **Food Chemistry**, v.76, p.197-205, 2002.

WU, C. et al. Influence of finishing systems on hydrophilic and lipophilic oxygen radical absorbance capacity (ORAC) in beef. **Meat Science**, v.80, p.662-667, 2008.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.5165-5170, 2001.

Capítulo 5

RESUMO

Efeitos do extrato de orégano na estabilidade oxidativa de hambúrgueres de ovelha embalados em atmosfera modificada

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos antioxidantes de extrato natural de orégano em hambúrgueres de ovelha armazenados em atmosfera modificada sob refrigeração, em busca de propriedades antioxidantes, maior saudabilidade e agregação de valor ao produto elaborado com carne de baixo valor comercial. A capacidade antioxidante do extrato de orégano foi determinada através de métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH^{*} e FRAP. Um total de 3 tratamentos de hambúrgueres, desenvolvidos em 2 repetições, foram preparados: sem antioxidante (controle - CO), com BHT 50 ppm e com extrato de orégano 1000 ppm. Para caracterização do produto cárneo, a composição centesimal foi determinada (umidade, lipídeos, proteínas e cinzas). A estabilidade foi avaliada a partir de análises físico-químicas (pH, cor, oxidação lipídica e protéica, perfil de ácidos graxos livres e de compostos voláteis), microbiológicas (contagem de totais viáveis, *Pseudomonas* spp., Enterobacteriaceae e bactéria ácido láctica) e análises sensoriais (escala hedônica de 5 pontos) que foram determinados em duplicata para cada ponto de amostragem durante 20 dias a 2±1°C. O extrato apresentou um interessante conteúdo fenólico e atividade antioxidante, com baixas contagens de microrganismos viáveis totais (CVT) e bactérias ácido lácticas (BAL), além de que uma capacidade semelhante para retardar reações de oxidação lipídica e protéica também foram observadas para os tratamentos com BHT e orégano após 20 dias. No entanto, resultados de ácidos graxos livres não apresentaram efeitos significativos ($P>0,05$) do extrato de orégano e a quantidade total de compostos voláteis aumentou ao longo do tempo ($P<0,01$). Todos os tratamentos apresentaram redução significativa ($P<0,001$) em valores de a^* durante estocagem, no entanto, ΔE_{0-20} revelou aumento significativo ($P<0,05$) para o tratamento CO em relação aos outros, indicando possível percepção na mudança de cor visual pelos consumidores. A presença do extrato natural impediu a perda da qualidade sensorial em hambúrgueres de ovelha até 15 dias de armazenamento, sendo que as mudanças no odor foram confirmadas pelos resultados microbiológicos indicando a deterioração ao longo do tempo. Em

conclusão, o extrato de orégano apresentou efeitos antioxidantes que promoveram a inibição da oxidação lipídica e protéica, e devido a isto o uso deste pode ser considerado como uma solução bastante viável, pelo apelo de saudabilidade, em comparação com o BHT.

Palavras-chave: análises sensoriais, antioxidante natural, carne ovina, *Origanum vulgare*, parâmetros de cor.

1 INTRODUÇÃO

Oxidação lipídica, crescimento microbiano e alterações de cor são os principais fatores que influenciam a deterioração em carnes e seus derivados. Durante a estocagem, os processos oxidativos promovem grandes impactos no sabor, textura e valor nutricional, além de promoverem consequentemente perdas na aceitabilidade pelo consumidor (RODRÍGUEZ-CARPENA, MORCUENDE e ESTÉVEZ, 2011).

O sistema de embalagem de alimentos sob atmosfera modificada (ATM) é considerado um método bastante eficaz para garantia da qualidade e segurança do alimento, inclusive de carnes frescas. Os gases mais utilizados são O₂ e CO₂ que podem ser aplicados em combinação ou individualmente de acordo com o tipo de alimento e o efeito desejável (CHOULIARA et al., 2011), sendo a eficácia dependente de inúmeros fatores extrínsecos, dentre eles, composição dos gases e proporção entre eles (MUELA et al., 2014). No entanto, baixas temperaturas também são necessárias para a maior eficiência e aumento da aceitação do produto pelo consumidor final, permitindo também a prevenção da oxidação de compostos bioativos constituintes dos alimentos (GUO et al., 2013; PEÑAS et al., 2010).

Para manutenção da cor, o armazenamento sob atmosfera modificada (ATM) com até 80% de oxigênio vem sendo muito estudado (LUND et al., 2007), assim como embalagens contendo entre 20 a 30% de dióxido de carbono, que podem reduzir o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes eficientemente (FERNANDES et al., 2014; PATSIAS et al., 2006), além de também possivelmente

prevenir a formação de carbonilas, pelo bloqueio do grupo amina dos aminoácidos lisina ou arginina (JONGBERG et al., 2011). Já para retardar a ocorrência de processos oxidativos, antioxidantes sintéticos são comumente adicionados durante processamento, visando ampliar o tempo de vida útil (DJENANE et al., 2002). Porém nos dias de hoje, devido a alta demanda por uma alimentação mais saudável, compostos fenólicos têm sido explorados como potenciais antioxidantes naturais para possível substituição aos sintéticos, sendo as pesquisas impulsionadas pela maior preocupação e conscientização do consumidor com relação a segurança do alimento (JENNINGS e AKOH, 2009).

Neste sentido, vários estudos mostram a grande eficácia do orégano (*Origanum vulgare* L.) (ARANHA e JORGE, 2012; TUTTOLOMONDO et al., 2013; ZHENG e WANG, 2001), em estudos sobre a estabilidade oxidativa (COLINDRES e BREWER, 2011; KIOKIAS, VARZAKAS e OREOPOULOU, 2008), atividades antimicrobiana (APOSTOLIDIS, KWON e SHETTY, 2008; CASTILHO et al., 2012; LICINA et al., 2013), anti-inflamatórias e anti-ulcerosas (ALBANO e MIGUEL, 2008; JOHNSON, 2011), de acordo com a composição química e genética e bioatividade (LUKAS e NOVAK, 2013; TEIXEIRA et al., 2013) de compostos, principalmente fenólicos, no caso do *Origanum vulgare* L., espécie de orégano mais pesquisada (EXARCHOU et al., 2002; SOUZA, STAMFORD e LIMA, 2006; SPIRIDON, BODIRLAU e TEACA, 2011; SUHAJ, 2006). No entanto, a atividade antioxidante e o perfil fenólico, depende, dentre outros fatores, das condições de extração a que são submetidas as ervas e especiarias (BALLARD et al., 2009).

Estudos mostram que o orégano, uma das plantas da família *Lamiaceae*, origina extrato natural com propriedades antioxidantes, inclusive quando agregado aos produtos cárneos (VELASCO e WILLIAMS, 2011), sendo considerado como um potente ingrediente para aumentar a qualidade e, conseqüentemente, a vida útil das carnes e de seus derivados (KARRE, LOPEZ e GETTY, 2013; MAKRI, 2013; ROJAS e BREWER, 2008; ZHENG et al., 2009).

Portanto, devido ao interesse em antioxidantes de fontes naturais e a falta de informações sobre o extrato de orégano em produtos à base de carne de ovelha, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito antioxidante deste extrato natural em conjunto com ATM durante armazenamento de hambúrgueres sob refrigeração por 20 dias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matérias primas (VER Capítulo 2 – subitem 2.1 e Capítulo 4 – subitem 2.1)

2.2 Preparo do extrato natural de orégano para análises de capacidade antioxidante e posterior elaboração de hambúrgueres de ovelha (VER Capítulo 2 – subitens 2.2 e 2.5)

2.3 Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de orégano por métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP (VER Capítulo 2 – subitens 2.3.1 e 2.3.2)

Para ensaios DPPH[•], os resultados foram expressos em µg/mL (EC₅₀).

2.4 Perfil de compostos fenólicos do extrato de orégano por LC-DAD-ESI/MS

A separação dos compostos fenólicos foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) *Agilent* 1100 equipado com sistema G1379A degasser, bomba gradiente binária G1312B, amostrador automático G1329A, coluna termostática G1316A e detector de arranjos de fotodiodos G1315C (DAD) (*Agilent Technologies*, Waldbronn, Alemanha). As amostras foram separadas em uma coluna *Zorbax SB C18* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EUA) de 150 x 3,0 mm I.D., 3,5 µm de tamanho de partícula, mantida a 25°C. O gradiente de eluição foi realizado com ácido acético (2,5%, v/v) (solvente A) e metanol contendo 2,5% de ácido acético (solvente B). O extrato foi dissolvido em fase móvel para obter uma concentração final de 2 mg/mL. O seguinte programa de gradiente foi aplicado, a uma taxa de fluxo de 1 mL/min: 0 min 95:5 (A:B v/v), 15 min 85:15 (A:B v/v), 35 min 70:30 (A:B v/v), 40 min 60:40 (A:B v/v), 50 min 40:60 (A:B v/v), 55 min 10:90 (A:B,

v/v), 55 min 0:100 (A:B v/v), 75 min 0:100 (A: B v/v). Os cromatogramas foram adquiridos a 240 e 370 nm com volume de injeção de 5 µl em triplicata.

As análises de espectrometria de massa para detecção dos compostos foram realizadas com um triplo quadrupolo *Agilent* 6410B, equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). Condições ESI foram as seguintes: temperatura: 350 °C, pressão do nebulizador: 35 psi, vazão de gás N₂ para secagem: 10 L/min, tensão fragmentor: 135 V e tensão capilar: 4500V. Espectros de varredura de massa completa foram registrados no modo de ionização negativa ao longo da gama de m/z 100-1600 Da (scans/s). O *software Agilent Masshunter Qualitative Analysis* B.04.00 foi utilizado para aquisição de dados e análise qualitativa.

Os compostos fenólicos presentes no extrato de orégano foram analisados por sua faixa característica de absorção no UV-visível, com λ_{max} de 190 a 380 nm por detector por arranjo de diodos (DAD) (MERKEN e BEECHER, 2000; ROBBINS, 2003) para os comprimentos de onda: 255 nm (ácidos hidroxibenzóicos), 280 nm (flavan-3-ol), 320 nm (ácidos *trans*-cinâmicos) e 360 (outros flavonóides) (MA et al., 2014). Após a análise espectrofotométrica, as amostras foram introduzidas no espectrômetro e para cada espectro de massa, os compostos fenólicos foram identificados por tentativa, a partir da comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção com padrões, além da comparação com dados da literatura sobre a fragmentação de compostos fenólicos e seus respectivos valores de máxima absorção no UV-visível.

2.5 Elaboração de hambúrgueres de ovelha

Três tratamentos de hambúrgueres [controle sem antioxidante (CO), butil-hidroxitolueno (BHT) 50 ppm e extrato de orégano 1000 ppm (ORE)] foram elaborados na planta piloto do "*Centro Tecnológico da Carne*", usando cortes de ovelhas mestiças de descarte com idades entre 6 a 12 anos. Hambúrgueres ovinos de 100 g (n = 2 por tratamento e tempo de armazenamento) foram elaborados a partir de um total de 5,7 kg de massa de carne, sendo que as carnes e a gordura foram descongeladas por 12 horas e picadas separadamente usando disco de 6

mm, em moedor (TALLERES RAMON, S.L., TOP-114, Espanha). Posteriormente, as carnes juntamente com NaCl (10 g/kg), foram homogeneizados em misturadeira (FUERPA, AO-85, Espanha) por 5 min, sendo a massa cárnea misturada e comprimida manualmente com os antioxidantes de acordo com o tratamento.

Os hambúrgueres foram elaborados em moldes de 10 cm de diâmetro e 1 cm de altura em um moldador (Gaser, A-2000, Girona, Espanha) e acondicionados em bandejas de poliestireno com 300 mm de espessura, que foram seladas com filme de polietileno de 74 mm de espessura e permeabilidade menor de 2 mL/(m² bar/dia) adequado para misturas de gases (Viduca, Alicante, Espanha). A embalagem foi selada utilizando uma termoseladora LARI3/Pn T-VG-R-SKIN (Ca.Ve.Co., Palazzolo, Itália), após a injeção de composição gasosa contendo 80% O₂ + 20% CO₂. As bandejas foram armazenadas a 2±1°C, com luz, simulando condições comerciais, sendo colocados sobre prateleiras de metal recebendo intensidade na faixa de 15-20 lux (Digital Luxometer, HT 306, Itália), de acordo com a posição da bandeja. A fonte de luz era convencional, e assim o comprimento de onda ou faixa, neste caso UV, não foi filtrada.

2.6 Determinação da composição centesimal (VER Capítulo 4 – subitem 2.7.2)

2.7 Estabilidade dos hambúrgueres de ovelha durante armazenamento

Todos os tratamentos foram submetidos à avaliação físico-química, microbiológica e sensorial, sendo as amostras avaliadas em duplicata nas 2 repetições para cada ponto de amostragem (0, 5, 10, 15 e 20 dias) durante armazenamento refrigerado.

2.7.1 Análises microbiológicas

De cada amostra foram colhidas 10 g assepticamente e homogeneizadas com 90 mL de água peptonada a 0,1% estéril em misturador (IUL Instruments, Masticator, Barcelona, Espanha) durante 2 min à temperatura ambiente. Diluições decimais seriadas foram preparadas para cada amostra em 0,1% de soluções de água peptonada (Merck, Darmstadt, Germany) e 1 mL ou 0,1 mL de amostras das diluições apropriadas em duplicata foram vertidas e espalhadas para a contagem total e placas de agar seletivas, respectivamente. A preparação das amostras, bem como a determinação dos microrganismos viáveis totais, bactérias ácido lácticas e *Pseudomonas spp.* seguiu métodos descritos pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 1986) e enterobactérias segundo metodologias descritas por Downes e Ito (2001).

A contagem de microrganismos viáveis totais (CVT) foi enumerada em *Plate Count Agar* (PCA; Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, Reino Unido), após incubação a 30°C durante 48 h. Bactérias ácido lácticas (BAL) foram determinadas em meio *Man-Rogosa-Sharpe Agar* (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, Reino Unido) ajustado para pH 5,6, após incubação em anaerobiose a 30°C durante 5 dias. *Pseudomonas spp.* foram determinadas em meio *Pseudomonas Selective Agar* (Merck, Darmstadt, Alemanha) com suplemento seletivo contendo Ceftriaxona, Fucidina e Cefaloridina (CFC) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e incubadas a 25°C durante 48 h. Enterobactérias foram enumeradas em *Violet Red Bile Glucose Agar* (Merck, Darmstadt, Alemanha), após incubação a 37°C durante 24 h. Foram selecionadas as placas contendo entre 30-300 colônias, sendo a contagem expressa em UFC/g de amostra.

2.7.2 pH (VER Capítulo 4 – subitem 2.8.1)

2.7.3 Parâmetros de cor instrumental (VER Capítulo 4 – subitem 2.8.2)

Não foi realizada determinação de índices de croma e ângulo Hue. A partir dos resultados obtidos, foram determinadas as diferenças de cor (ΔE) entre hambúrgueres do dia 0 e aos 20 dias de estocagem, calculados como: $\Delta E_{0-20} = [(L_{20} - L_0)^2 + (a_{20} - a_0)^2 + (b_{20} - b_0)^2]^{1/2}$ (LORENZO et al., 2014).

2.7.4 Oxidação lipídica - TBARS (VER Capítulo 4 – subitem 2.8.3)

2.7.5 Oxidação protéica (VER Capítulo 4 – subitem 2.8.4)

2.7.6 Perfil de ácidos graxos livres (AGL) (VER Capítulo 4 – subitem 2.8.6)

2.7.7 Perfil de compostos voláteis (VER Capítulo 4 – subitem 2.8.7)

2.7.8 Análises sensoriais

Amostras de hambúrguer foram avaliadas por 14 provadores de uma equipe do "Centro Tecnológico da Carne". Os provadores foram treinados de acordo com a metodologia proposta por Jellinek (1985) e normas ISO (ISO 8586-1, 1993; ISO 5496, 2006) quanto aos atributos e escala a serem utilizados. O teste foi aplicado utilizando escala hedônica de 5 pontos para cada atributo avaliado, segundo Meilgaard, Civille e Carr (2006): cor vermelha (1 = extremamente alta, 2 =

moderadamente alta, 3 = média, 4 = moderadamente baixa, 5 = extremamente baixa), descoloração superficial (1 = nada, 2 = 0-10%, 3 = 11-20%, 4 = 21-60% e 5 = 61-100%) e odor (1 = excelente, 2 = bom, 3 = aceitável, 4 = dificilmente aceitável, 5 = não aceitável).

2.8 Análises estatísticas e delineamento experimental

Para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos naturais, os ensaios para cada uma das 3 repetições foram realizados em triplicata e os resultados expressos em média $\pm$ erro padrão, enquanto que para avaliação da estabilidade oxidativa dos produtos cárneos, os ensaios das 2 repetições foram realizados em duplicata utilizando delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 5, ou seja, 3 tratamentos (CO, ER, ORE) avaliados em 5 tempos de estocagem (0, 5, 10, 15 e 20 dias), cujos resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão. Todos os resultados finais foram avaliados por análise de variância (ANOVA), utilizando-se o pacote estatístico SPSS (SPSS 17.0, Chicago, IL, USA), sendo que, em caso de diferença significativa, as médias foram comparadas através do teste de Duncan, ao nível de 5% de significância. As correlações entre as variáveis ($P < 0,05$) foram determinadas por análise do coeficiente de correlação linear de Pearson com o pacote de software estatístico mencionado anteriormente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Conteúdo fenólico e atividade antioxidante do extrato de orégano

O teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante *in vitro* do extrato de orégano podem ser visualizados na Tabela 20. Em geral, compostos fenólicos de extratos naturais apresentam uma correlação positiva com a atividade antioxidante, conforme confirmado no capítulo 1, podendo agir como agentes doadores de

hidrogênio, eliminadores de radicais livres, quelantes metálicos e desativadores de oxigênio singlete devido ao seu potencial redutor elevado (GANHÃO, MORCUENDE e ESTÉVEZ, 2010; KRISHNAN et al. 2014).

Neste caso, estudos comprovam a capacidade eliminadora de radicais livres pela ação de extrato do orégano, devido ao conteúdo fenólico que contribui para uma alta capacidade antioxidante total, sendo considerada uma promissora fonte natural (APOSTOLIDIS, KWON e SHETTY, 2008; DORMAN et al. 2003; GAWLIK-DZIKI, 2012; LAGOURI e NISTEROPOULOU, 2009; LAGOURI, GULDAS e GURBUZ, 2011; MORAIS et al., 2009; SHAN et al., 2005; TUSEVSKI, KOSTOVSKA e ILOSKA, 2014; VALLVERDÚ-QUERALT et al., 2014; ZHENG e WANG, 2001).

Tabela 20 – Capacidade antioxidante do extrato de orégano (média±erro padrão).

Método	Extrato
Folin-Ciocalteu ¹	52,11±0,79
DPPH ²	72,53±2,36
FRAP ³	344,09±5,24

¹Resultados expressos em mg equivalente ácido gálico/g; ²Resultados expressos em µg/mL (EC₅₀);

³Resultados expressos em µmol equivalente trolox/g de peso seco (n = 3).

Fonte: Própria autoria.

3.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos do extrato de orégano

Foram identificados 25 compostos fenólicos no extrato de orégano (Tabela 21), incluindo derivados de ácidos hidroxibenzóicos, hidroxicinâmico, flavonóides e outros compostos fenólicos.

Os compostos derivados de ácidos hidroxibenzóicos foram identificados nos picos 5, 7, 8, 10 e 37. O pico 5 foi identificado como ácido hidroxibenzóico-O-hexosídeo pela presença do íon molecular em m/z 299, íons produto em m/z 137 e UV $\lambda_{\max}$ em 250 nm. O composto do pico 7 apresentou íon precursor em m/z 153, íon produto em m/z 109 e UV $\lambda_{\max}$ em 295 nm, sugerindo o ácido protocatecuico. O pico 37 foi conceivelmente ácido siríngico com a $[M-H]^-$ em m/z 197 e íon produto a m/z 135. Hossain et al. (2010) observaram o mesmo íon precursor e fragmentos para o extrato de orégano que os observados nos picos 5, 7 e 37. Sun et al. (2007)

reportou os íons identificados no pico 8 para o padrão de ácido siríngico, porém o valor de UV $\lambda_{\max}$ não foi detectado no presente estudo. O valor de UV $\lambda_{\max}$ para o ácido hidroxibenzoico-O-hexosídeo foi observado por Parejo et al. (2004) em erva-doce e o valor de UV $\lambda_{\max}$ para o ácido protocatecuico foi reportado por Guimarães et al. (2013) em camomila selvagem da Alemanha. O candidato proposto para o pico 8 foi o ácido gentísico, que apresentou íon precursor em m/z 153 e fragmento em m/z 109. Sun et al. (2007) reportou a presença do ácido gentísico em vinho tinto. O composto do pico 10 foi identificado como ácido salicílico, apresentando íon molecular em m/z 137. Sánchez-Rabaneda et al. (2004) observaram o mesmo composto em extrato de resíduo de maçã.

Os compostos derivados de ácidos hidroxicinâmicos foram identificados no extrato de orégano nos picos 38 e 39. O candidato proposto é o ácido rosmarínico, que apresentou $[M-H]^-$ em m/z 359 e fragmentos em m/z 197 e 161. O valor de UV $\lambda_{\max}$ observado (288 e 330 nm) são similares aos apresentados por Almela et al. (2006) em alecrim selvagem. Os fragmentos observados no presente estudo são similares aos reportados por Hossain et al. (2010) e Parejo et al. (2004), que também reportaram o fragmento em m/z 179.

Os picos 6, 13, 28, 35, 36, 41, 42, 45, 47, 50, 52, 53 e 54 foram agrupados na classe dos flavonóides. O composto do pico 13 foi identificado como galocatequina, o qual apresentou íon precursor em m/z 305 e íons produto em m/z 225 (Hossain et al., 2010). O pico 28 apresentou íon molecular em m/z 285 e UV $\lambda_{\max}$ em 256, 268 e 348 nm, sugerindo a luteolina como provável composto (LIN et al., 2007). O candidato proposto para o pico 35 foi luteolina-7-O-rutinosídeo, que apresentou íon molecular em m/z 593 e fragmento em m/z 285. A perda de 308 unidades de massa (porção rutinosídeo hidratada) gerou o fragmento aglicona (m/z 285) que corresponde a luteolina (HOSSAIN et al., 2010). O mesmo padrão foi observado no pico 36, o que possibilitou a identificação como luteolina-7-O-glicosídeo. A perda de uma glicose hidratada (162 u) do $[M-H]^-$ em m/z 447 formou um fragmento de luteolina (m/z 285).

O pico 41 foi identificado como eriodictiol (m/z 287), o qual apresentou íons produto em m/z 151 e 135 e UV $\lambda_{\max}$ em 288 e 338 nm. Lin et al. (2007) reportou o mesmo íon precursor e valores de UV $\lambda_{\max}$ para o padrão de eridictiol para o orégano mexicano (*Lippia graveolens*). O composto do pico 42 foi identificado como diidroximetoxiflavona di-glucoronídeo, o qual apresentou íon precursor em m/z 635,

fragmentos em m/z 283 e UV $\lambda_{\max}$ em 266 e 338 nm. Similares íons e valores de absorbância foram observados por Lin et al. (2009) em extratos *Teucrium canadense* e *T. chamaedrys*. O pico 45 apresentou íon molecular em m/z 271 e UV $\lambda_{\max}$ a 290 e 330 nm, sendo identificado como naringenina (LIN et al., 2007). O composto do pico 47 foi identificado como acacetina-7-O-glucuronideo, com $[M-H]^-$ em m/z 459 e íon produto em m/z 283. O mesmo padrão de fragmentação foi observado por Lin e Harnly (2010) na flor de crisântemo.

O composto do pico 50 era provavelmente apigenina, gerando $[M-H]^-$ em m/z 269 e fragmento em m/z 151. O provável composto para o pico 52 era o crisoeriol, que apresentou íon precursor em m/z 299 e íon produto em m/z 284. Estes compostos foram observados em extrato de resíduo de maçã por Sánchez-Rabaneda et al. (2004). O pico 53 foi identificado como acacetina e o pico 54 como metilapigenina, uma vez que esses compostos são isômeros na posição do grupo metil, foi identificado o mesmo íon molecular em m/z 283 e fragmento em m/z 268. A presença dos dois compostos foi reportada por Hossain et al. (2010), que também indicou que a acacetina eluiu antes da metilapigenina, devido a pequena diferença de polaridade. Os compostos dos picos 3, 6, 12 e 57 foram identificados como derivados de catequina/epicatequina por terem apresentado UV $\lambda_{\max}$ em 280 nm, característico para flavan-3-ol (SUN et al., 2007).

Outros compostos fenólicos foram identificados no extrato de orégano nos picos 14, 15, 33, 34, 40 e 51. O candidato proposto para o pico 14 foi o epirosmanol, o qual apresentou $[M-H]^-$ em m/z 345 e íons produto em m/z 301 e 283 (HOSSAIN et al., 2010). O pico 15 foi identificado como ácido 4-cafeeoil-3,5-disuccinoilquínico com íon molecular em m/z 553 e fragmentos em m/z 391, 217 e 173. Íons similares foram observados por Carbonara et al. (2012) em folhas de *Artemisia annua* L. Os picos 33 e 34 foram identificados como 4-(3,4-dihidroxibenzoiloximetil) fenil- β -D-glicopiranosídeo, apresentando íon precursor em m/z 421 e fragmentos em m/z 153. Nagy et al. (2011) encontraram os mesmos íons e fragmentos em orégano submetido a radiação. Já em estudos realizados por Martins et al. (2014), foram encontrados resultados similares aos do presente. O composto do pico 40 foi identificado como ácido salvianólico J, com $[M-H]^-$ m/z 537 e íon produto em m/z 493 e 295. Liu et al. (2007) observaram os mesmos íons em raiz seca de *Salvia miltiorrhiza*, um conhecido remédio tradicional na cultura chinesa. O composto do

pico 51 é provavelmente o metoxicarnosol, com íon molecular em m/z 359 e fragmento em m/z 329 (HOSSAIN et al., 2010).

Diversos novos compostos foram identificados no extrato de orégano, indicando uma ampla variedade na composição fenólica. Os flavonóides foram os compostos identificados em maior número, seguido pelos outros fenólicos e os ácidos hidroxibenzóicos, o que está de acordo com outros estudos (HOSSAIN et al., 2010; NAGY et al., 2011). Entretanto, os demais picos detectados não puderam ser identificados com base nos espectros de massa e/ou dados de absorbância determinados, sendo denominados como “desconhecidos”.

Tabela 21 – Identificação por tentativa dos compostos fenólicos em extrato de orégano. (continua)

ID #	Composto fenólico	TR (min)	PM	[M-H] ⁻ (m/z)	Íon produto (m/z)	Abs (λ , nm)	%	ref
1	Desconhecido	1,31	660	659	501, 343, 201	nd	2,5	
2	Desconhecido	1,65	702	701	539, 341, 191	nd	16,7	
3	Derivado de catequina/epicatequina	3,35	597	596	271 , 161, 108	280	7,0	n
4	Desconhecido	5,10	542	541	134 , 123	nd	1,50	
5	Ácido hidroxibenzóico-O-hexosídeo	6,49	300	299	137	250	0,4	a, e
6	Derivado de catequina/epicatequina	8,28	1281	1280	655, 219 , 135	280	0,2	n
7	Ácido protocatecuico	9,23	154	153	109	295	0,3	a, d
8	Ácido gentísico	10,81	154	153	109	nd	0,1	f
9	Desconhecido	11,42	1412	1411	335, 209, 108	nd	0,4	
10	Ácido salicílico	13,26	138	137	nd ^e	nd	0,2	g
11	Desconhecido	15,91	981	980	641, 359 , 283	nd	0,1	
12	Derivado de catequina/epicatequina	18,44	688	687	391, 283, 121	280	0,1	n
13	Galocatequina	22,15	306	305	225	nd	0,1	a
14	Epirosmanol	23,39	346	345	301, 283	nd	0,2	a
15	Ácido 4-Caffeoil-3,5-disuccinoilquinico	24,19	554	553	391 , 217, 173	nd	0,5	l
16	Desconhecido	24,70	555	554	553, 391	255	2,0	
17	Desconhecido	26,09	1281	1280	659, 385 , 101	nd	0,3	
18	Desconhecido	27,59	422	421	409, 387	nd	2,0	
19	Desconhecido	28,32	798	797	485, 409, 387	nd	3,2	
20	Desconhecido	28,91	722	721	609, 407 , 283	nd	0,3	
21	Desconhecido	29,63	659	658	609, 407 , 283	nd	0,7	

(continuação)

ID #	Composto fenólico	TR (min)	PM	[M-H] ⁻ (m/z)	Íon produto (m/z)	Abs (λ, nm)	%	ref
22	Desconhecido	30,27	795	794	659, 609 , 173,	nd	0,1	
23	Desconhecido	31,19	981	980	685, 659 , 141	nd	0,5	
24	Desconhecido	32,91	594	593	nd ^e	271, 336	2,8	
25	Desconhecido	33,52	594	593	nd ^e	270, 336	5,3	
26	Desconhecido	34,61	584	583	665, 421 , 233	nd	0,7	
27	Desconhecido	35,90	792	791	637 , 391, 285	265, 348 256,	1,0	
28	Luteolina	36,53	286	285	nd ^e	268, 348	1,8	c
29	Desconhecido	37,24	584	583	391 , 281	260	7,1	
30	Desconhecido	37,94	586	585	583 , 421	nd	2,4	
31	Desconhecido	38,45	478	477	433 , 339, 135	329	2,2	
32	Desconhecido	38,89	478	477	433 , 421	nd	3,0	
33	4-(3,4-dihidroxibenzoiloximetil)phenil-β-D-glicopiranosideo	39,64	422	421	153	262, 291	24,7	b, h
34	4-(3,4-dihidroxibenzoiloximetil)phenil-β-D-glicopiranosideo	40,10	422	421	153	262, 292	36,8	b, h
35	Luteolina-7-O-rutinoside	41,07	594	593	285	256, 265, 349	1,4	a, e
36	Luteolina-7-O-glucoside	41,85	448	447	285	254, 265, 346	4,9	a, c
37	Ácido Siringico	42,87	198	197	135	nd	4,3	a
38	Ácido Rosmarinico	44,11	360	359	197, 161	288, 330	24,6	a, j
39	Ácido Rosmarinico	44,40	360	359	197, 161	288, 330	38,5	a, j
40	Ácido Salvianólico J	44,81	538	537	493, 295	288, 330	2,4	i
41	Eriodictiol	45,62	288	287	151, 153	288, 338	1,2	c
42	Dihidroximetoxiflavona di-glucuronideo	46,17	636	635	283	266, 338	2,6	l

(conclusão)

ID #	Composto fenólico	TR (min)	PM	[M-H] ⁻ (m/z)	Íon produto (m/z)	Abs (λ, nm)	%	ref
43	Desconhecido	46,85	606	605	549 , 417, 135	nd	4,2	
44	Desconhecido	48,12	586	585	583	298	45,8	
45	Naringenina	48,92	272	271	nd	290, 330	10,4	c
46	Desconhecido	49,38	628	627	563 , 421, 283	252, 334, 352	1,0	
47	Acacetina-7-O-glucuronideo	49,92	460	459	283	240, 270, 331	6,4	k
48	Desconhecido	50,79	576	575	539 , 515	288	2,1	
49	Desconhecido	51,88	360	359	301 , 135	288	2,1	
50	Apigenina	52,25	270	269	151	286, 344	0,6	g
51	Metoxicarnosol	53,66	360	359	329	nd ^e	1,1	a
52	Crisoeriol	54,26	300	299	284	nd ^e	1,6	g
53	Acacetina	54,99	284	283	268	nd ^e	0,6	a
54	Metilapinegina	55,33	284	283	268	nd ^e	0,4	a
55	Desconhecido	55,60	756	755	588 , 337, 217	nd	0,5	
56	Desconhecido	57,20	1046	1045	353 , 250, 141	nd	3,5	
57	Derivado de catequina/epicatequina	57,64	340	339	163	280	100,0	n
58	Desconhecido	58,44	879	878	665, 339 , 141	nd	3,5	

Tempo de retenção (TR), íon molecular ([M-H]⁻), peso molecular (PM), absorvância (Abs), não determinado (nd). Os íons mais abundantes são marcados em negrito.

^a Identificação por tentativa baseada nos dados de espectro de massa citados por Hossain et al. (2010).

^b Identificação por tentativa baseada nos dados de espectro de massa citados por Nagy et al. (2011).

^c Identificação por tentativa baseada nos dados de espectro de massa e absorvância citados por Lin et al. (2007).

^d Identificação por tentativa baseada nos dados de espectro de massa citados por Guimarães et al. (2013).

^e Identificação por tentativa baseada nos dados de espectro de massa citados por Parejo et al. (2004).

^f Identificação por tentativa baseada nos dados de espectro de massa citados por Sun et al. (2007).

^g Identificação por tentativa baseada nos dados de espectro de massa citados por Sánchez-Rabaneda et al. (2004).

^h Identificação por tentativa baseada nos dados de espectro de massa citados por Martins et al et al. (2014).

ⁱ Identificação por tentativa baseada nos dados de espectro de massa citados por Liu et al. (2007).

^j Identificação por tentativa baseada nos dados de absorvância citados por Almela et al. (2006).

^k Identificação por tentativa baseada nos dados de espectro de massa citado por Lin e Harnly (2010).

^l Identificação por tentativa baseada nos dados de espectro de massa e absorvância citados por Carbonara et al. (2012).

^m Identificação por tentativa baseada nos dados de espectro de massa citado por Lin et al. (2009).

ⁿ Identificação por tentativa baseada nos dados de absorvância citados por Sun et al. (2007).

(n = 3).

Fonte: Própria autoria.

3.3 Composição centesimal

A massa cárnea usada para a elaboração dos hambúrgueres apresentou $67,34 \pm 0,21\%$ de umidade, $11,09 \pm 0,64\%$ de lipídeos, $17,92 \pm 0,20\%$ de proteína e $1,98 \pm 0,02\%$ (médias $\pm$ erro padrão) de cinzas, mantendo-se dentro dos limites máximos e mínimos, respectivamente, para lipídeos e proteínas conforme Instrução Normativa n.º 20, de 31 de julho de 2000 (BRASIL, 2000). Apesar da existência de muitas variações de acordo com a formulação, resultados similares foram encontrados por Ferreira et al. (2011) para hambúrgueres de carne bovina, com umidade variando de 62,95-65,23%, proteínas de 16,76-18,66% e lipídeos 10,87-12,08% e em estudos realizados por Linares et al. (2012), cujos hambúrgueres de cordeiro apresentaram 71,56% de umidade, 19,56% proteínas e 1,80% em minerais.

3.4 Evolução microbiana durante armazenamento

A influência de extratos naturais sobre as mudanças na contagem de viáveis totais, bactérias ácido lácticas, enterobactérias e *Pseudomonas* spp. ao longo do tempo de armazenamento encontram-se resumidos na Figura 32 (A, B, C e D, respectivamente).

Figura 32 – Alterações microbianas de hambúrgueres de ovelha durante armazenamento a 2°C (n = 4).

Fonte: Própria autoria.

Contagens iniciais de viáveis totais foram de cerca de 5 log₁₀ UFC/g, e nenhuma diferença significativa ($P>0,05$) foi observada entre os tratamentos. Durante o armazenamento, a CVT aumentou significativamente ($P<0,001$) para todos os tratamentos até ao final do período, sendo que o tratamento BHT (8,69 log₁₀ UFC/g) não diferiu daquele contendo orégano (8,95 log₁₀ UFC/g), mas sim do controle (9,11 log₁₀ UFC/g) ($P<0,05$). Neste caso, esta similaridade encontrada entre tratamentos contendo antioxidantes está de acordo com propriedades antimicrobianas de extrato de orégano, conforme previamente relatadas em outros estudos, principalmente devido à presença de compostos fenólicos (KRISHNAN et al., 2014; SHAN et al., 2007, 2009).

Bañón et al. (2007), verificando efeitos de adição de extratos naturais de chá verde e semente de uva em hambúrgueres bovinos crus, também observaram maiores contagens de viáveis totais (6,40 log₁₀ UFC/g) para o tratamento controle aos 9 dias em condições aeróbias a 4°C, bastante próximo aos valores encontrados no presente estudo aos 10 dias (6,33 a 6,77 log₁₀ UFC/g).

Apesar disto, considerando-se que o início da deterioração ocorre a partir de contagens de 10⁶ UFC/g (LEITÃO, 2003), sendo este valor também um indicador de deterioração para a maioria dos alimentos segundo a Legislação Espanhola (Regulation EC 2073/05, de L338/1, 2005), devido principalmente às alterações do odor (DAINTY e MACKEY, 1992), com limites máximos de 10⁷ UFC/g (ICMSF, 1986; NTZIMANI, GIATRAKOU e SAVVAIDIS, 2010), o tempo de vida de prateleira dos hambúrgueres armazenados nas condições deste estudo seria de no máximo 10 dias para todos os tratamentos, sendo a partir de 15 dias considerados inaceitáveis microbiologicamente. Luo et al. (2007) encontraram resultados semelhantes para ervas medicinais chinesas em hambúrgueres ovinos armazenados a 4°C, quando a redução significativa para CVT durante o armazenamento foi observada, porém com comprometimento da qualidade após 7 dias para todas as amostras. No entanto, Das Rajkumar e Dwivedi (2011), não relataram efeitos antimicrobianos com adição de folha de curry em pó em hambúrgueres de cabra crus e cozidos estocados durante 9 dias a 4 °C, assim como Carpenter et al. (2007), estudando mesmo produto cárneo a base de carne suína crua e contendo extrato de semente de uva ou *bearberry* sob refrigeração em atmosfera modificada (75% O₂ + 25% CO₂) por 12 dias.

Contagem de enterobactérias não demonstrou diferenças significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos e ao longo do tempo de armazenamento variando entre 3 e 4 $\log_{10}$ UFC/g. Por outro lado, *Pseudomonas* spp. não apresentaram diferenças ($P>0,05$) entre os tratamentos durante armazenamento, porém amostras contendo BHT e orégano apresentaram variações ($P<0,05$) ao longo do período, com contagens variando de 4 a 5 $\log_{10}$ UFC/g. Além disto, contagens de BAL aumentaram significativamente ($P<0,01$) ao longo do tempo para todos os tratamentos, sendo que aos 20 dias, foram observadas diferenças significativas ($P<0,05$) em que o controle apresentou maiores valores (7,82 $\log_{10}$ UFC/g) em comparação ao BHT (6,09 $\log_{10}$ UFC/g) e orégano (6,14 $\log_{10}$ UFC/g).

Lorenzo et al. (2014) estudaram os efeitos de extratos naturais em hambúrgueres de carne suína armazenados sob atmosfera modificada e obtiveram resultados semelhantes para amostras contendo extratos de folhas de algas e castanhas, quanto às contagens de *Pseudomonas* spp. No entanto, Tajik et al. (2014) observaram redução significativa de *Pseudomonas* spp. e nenhum efeito sobre as contagens de BAL em hambúrgueres de carne de búfalo com extrato de semente de uva durante o armazenamento.

Alguns autores têm sugerido que o uso de extratos de plantas ricos em compostos fenólicos prolonga o tempo de vida de prateleira de carnes e produtos cárneos, devido à alta atividade antimicrobiana, sendo o orégano uma das especiarias com maior potencial (HYGREEVA, PANDEY e RADHAKRISHNA, 2014; KRISHNAN et al., 2014; SHAN et al., 2007). Isso pode ser comprovado devido à ampla composição fenólica encontrada em estudos de perfil do extrato de orégano, conforme anteriormente apresentados, sugerindo atividade antimicrobiana compatível ao BHT. Entretanto, mesmo assim, a vida útil geralmente é limitada pela deterioração microbiana dependendo das condições de estocagem, bem como da carga microbiana inicial da matéria prima (BAÑÓN et al., 2007). Além disto, variações quanto ao efeito antimicrobiano ocorrem devido a concentração de extrato e ao sistema de embalagem utilizado (GARRIDO et al., 2011).

3.5 Evolução do pH e parâmetros de cor durante o armazenamento

O pH e os parâmetros de cor durante o armazenamento refrigerado são apresentados na Tabela 22. Quanto ao pH não houve alterações significativas ao longo do tempo de estocagem e a adição do antioxidante natural não demonstrou diferenças entre os tratamentos ($P>0,05$), sendo que aos 20 dias permaneceram entre 5,84 e 5,96. Sánchez-Escalante et al. (2003) observaram comportamento similar para hambúrgueres bovinos armazenados por 24 dias sob atmosfera modificada (70% O₂ + 20% CO₂ + 10% N₂) a $2\pm1^{\circ}\text{C}$, em que tratamentos contendo extrato de orégano apresentaram pH semelhante durante o período, de no máximo 5,71. No entanto, partindo de pH inicial de 5,62-5,70, Shan et al. (2009) observaram valores entre 6,07 e 6,19 ao final da estocagem de amostras de carne suína crua contendo extratos naturais, inclusive de orégano, enquanto que o controle atingiu 6,82, o que neste caso justificou a ocorrência de alterações na estabilidade da cor.

Tabela 22 – pH e parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) de hambúrgueres de ovelha durante armazenamento a 2°C (média±erro padrão).

Variáveis	Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)					Sign
		0	5	10	15	20	
pH	CO	5,87±0,03	5,90±0,01	5,90±0,02	5,92±0,03	5,95±0,08	n.s.
	BHT	5,85±0,04	5,87±0,01	5,94±0,05	5,91±0,02	5,84±0,03	n.s.
	ORE	5,82±0,06	5,89±0,02	5,90±0,03	5,85±0,01	5,96±0,07	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
L^*	CO	39,41±0,67 ^{a1}	39,43±0,75 ^a	41,25±1,13 ^a	43,28±0,43 ^{ab}	45,83±2,82 ^b	*
	BHT	42,27±0,69 ²	40,95±0,41	41,65±0,54	42,18±1,16	40,95±1,07	n.s.
	ORE	42,29±0,40 ²	40,04±0,95	40,81±1,13	42,53±1,16	41,29±1,77	n.s.
	Sign.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
a^*	CO	19,51±0,38 ^d	16,37±0,90 ^c	12,36±0,87 ^{b1}	10,71±0,12 ^{b1}	7,50±0,27 ^{a1}	***
	BHT	21,25±0,49 ^d	17,55±1,07 ^c	14,80±0,25 ^{b2}	12,94±0,76 ^{b2}	10,87±0,25 ^{a3}	***
	ORE	19,90±0,55 ^d	16,12±0,55 ^c	13,64±0,29 ^{b1,2}	12,58±0,37 ^{b2}	8,85±0,56 ^{a2}	***
	Sign.	n.s.	n.s.	*	**	**	
b^*	CO	17,64±0,56	15,99±0,80	15,61±0,94	16,35±0,29	16,59±0,76	n.s.
	BHT	19,23±0,33 ^c	17,23±0,43 ^b	16,66±0,36 ^{ab}	16,14±0,24 ^{ab}	15,44±0,64 ^a	***
	ORE	18,48±0,33 ^b	15,86±0,58 ^a	15,72±0,59 ^a	16,11±0,24 ^a	14,79±0,73 ^a	**
	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

Tratamentos: CO = controle sem antioxidante, BHT = butil-hidroxitolueno 50 ppm e ORE = extrato de orégano 1000 ppm. ^{a,b,c,d}: Valores médios na mesma linha (correspondente ao mesmo tratamento) não seguido de letra comum diferem significativamente ($P<0,05$). ^{1,2}: Valores médios na mesma coluna (correspondente ao mesmo tempo de armazenamento) não seguido por número comum diferem significativamente ($P<0,05$).

Sign.= Significância: *** ($P<0,001$), ** ($P<0,01$), * ($P<0,05$), n.s. não significativo ($P\geq 0,05$) ($n = 4$).

Fonte: Própria autoria.

No tempo inicial de armazenamento os hambúrgueres apresentaram um valor superior ($P<0,05$) para L^* nos tratamentos contendo BHT e orégano em comparação

ao tratamento controle. Entretanto, durante o armazenamento, o valor L^* para BHT e orégano manteve-se estável ($P>0,05$) e o tratamento controle apresentou aumento ao longo do tempo ($P<0,05$). Neste caso, como a umidade influencia diretamente na L^* (LORENZO et al., 2012), e o controle apresentou uma maior oxidação protéica em relação aos outros tratamentos ($P<0,05$), sugere-se que este comportamento seja uma consequência da menor retenção de água no produto cárneo, o que promove maior reflexão da luz, já que a água está presente na superfície.

Comportamento contrário foi observado para b^* , em que houve uma queda nos valores ($P<0,01$) ao longo do tempo para BHT e orégano, enquanto que para o controle não foi notada diferença significativa durante o período de armazenamento, porém com tendência à redução. No entanto, aos 20 dias os tratamentos não diferiram entre si ($P>0,05$).

Durante a estocagem valores de a^* sofreram redução significativa ($P<0,001$) para todos os tratamentos. No entanto, aos 20 dias, orégano e BHT mantiveram-se com valores significativamente ($P<0,01$) mais elevados do que o tratamento controle, porém, tratamento contendo orégano apresentou menor valor em comparação ao BHT ($P<0,01$), justificável pela coloração do extrato que pode ter influenciado na redução dos valores de a^* , afetando negativamente a cor vermelha do produto durante o armazenamento, de acordo com Kim, Cho e Han (2013). Mesmo comportamento foi verificado por estes autores em hambúrgueres bovinos controle, sem antioxidantes, que apresentaram menor valor de a^* ($P<0,05$) em comparação às amostras contendo extratos naturais de folhas verdes e BHT durante 12 dias a 4°C , sendo que este último apresentou um valor significativamente maior em relação aos contendo antioxidantes naturais. Hayes et al. (2010) notou que hambúrgueres bovinos sem adição de ingredientes funcionais, armazenados sob condições similares as do presente estudo, apresentaram também redução da oximioglobina durante o armazenamento, de 70 para 40% ao final de 12 dias, porém neste caso, produtos contendo extrato de folha de oliveira mantiveram valores a^* significativamente superiores.

A descoloração dos hambúrgueres está relacionada com o acúmulo de metamioglobina, sendo que os radicais livres oxidam o íon ferroso (Fe^{+2}) da oximioglobina em íon férrico (Fe^{+3}) que constitui a metamioglobina (FAUSTMAN et al., 2010). A maioria dos compostos fenólicos são hidrossolúveis e essa característica permite a interação direta com a mioglobina, proteína também solúvel

em água, o que provavelmente a protege contra descoloração, reduzindo também a oxidação lipídica (KROLL e RAWEL, 2001).

A diferença na cor durante o armazenamento ($\Delta E_0 - 20$) revelou valor significativamente maior ($P < 0,05$) para o tratamento controle em comparação ao BHT e orégano (Tabela 23). Contudo, valores foram superiores a 2, segundo limite utilizado por Lorenzo et al. (2014), indicando que as alterações visuais de cor seriam percebidas pelos consumidores durante o armazenamento. Desta maneira, este resultado indica que as amostras contendo antioxidante apresentaram coloração mais vermelha do que os hambúrgueres do grupo controle, influenciando na formação de metamioglobina, confirmando resultados obtidos para a*. Assim, a adição do antioxidante natural auxiliou na preservação da cor vermelha exercendo função similar ao BHT, sendo este um efeito positivo e de grande influência no momento da compra por parte dos consumidores, já que a diminuição deste parâmetro pode tornar o produto cárneo inaceitável (RENERRE, 2000).

Resultados semelhantes foram observados por Rodríguez-Carpena, Morcuende e Estévez (2011) para extrato de subprodutos de abacate em hambúrgueres suínos, sendo que a degradação da cor vermelha foi retardada em comparação às amostras controles ao final de 15 dias de armazenamento a 4°C, devido a presença de compostos fenólicos. Similarmente, Sánchez-Escalante et al. (2003), encontraram em hambúrgueres bovinos, armazenados por 20 dias, menor formação de metamioglobina superficial ($P < 0,05$) com adição de extrato de orégano.

Tabela 23 – Diferença de cor total ($\Delta E_0 - 20$) mensurada na superfície de hambúrgueres de ovelha entre os dias 0 e 20 de armazenamento a 2°C (média±erro padrão).

Amostra	$\Delta E_0 - 20$
CO	15,51±1,23 ^b
BHT	11,38±0,42 ^a
ORE	10,47±0,99 ^a
Sign.	*

Tratamentos: CO = controle sem antioxidante, BHT = butil-hidroxitolueno 50 ppm e ORE = extrato de orégano 1000 ppm.

^{a-b}: Médias com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Sign.= Significância: *** ($P < 0,001$), ** ($P < 0,01$), * ($P < 0,05$), n.s. não significativo ($P \geq 0,05$) (n = 4).

Fonte: Própria autoria.

3.6 Evolução da oxidação lipídica durante o armazenamento

A estabilidade lipídica de hambúrgueres de ovelha durante o armazenamento refrigerado pode ser visualizada na Figura 33. Tratamentos controle e BHT apresentaram aumento significativo ($P < 0,001$) ao longo do tempo, sendo que no controle a oxidação foi significativamente mais intensa do que os outros tratamentos a partir do 5º dia ($P < 0,01$) até o final do armazenamento atingindo valor de $6,45 \pm 0,37$ mg MDA/kg após 20 dias ($P < 0,001$). Neste caso, tratamentos contendo BHT e orégano apresentaram a mesma capacidade de retardar reações de oxidação lipídica, uma vez que não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre eles após 20 dias de armazenamento, com inibição de cerca de 40-50% em comparação ao controle. Colindres e Brewer (2011) também verificaram uma redução do conteúdo de TBARS em hambúrgueres bovinos contendo extrato aquoso de orégano (44%) em relação ao controle, após congelamento por 6 meses.

Quanto a este comportamento dos antioxidantes, Movileanu et al. (2013), confirmaram efeito similar em extrato de alecrim em relação ao BHT/BHA adicionados em hambúrgueres bovinos sob refrigeração por 28 dias. Similarmente Sebranek et al. (2005) comprovaram equivalência do extrato de alecrim ao BHA/BHT em linguças frescas refrigeradas por 14 dias, assim como também observado em hambúrgueres bovinos congelados por 3 meses comparando-se extratos de chá verde e de erva-mate com BHT, que permaneceram com valores entre 0,5 e 0,8 mg MDA/kg de amostra. Lara et al. (2011) avaliando hambúrgueres suínos cozidos e armazenados sob atmosfera modificada (70% N_2 + 30% CO_2) a $4 \pm 1^\circ C$ por 6 dias, adicionados de extratos naturais de alecrim e melissa, e antioxidante sintético, também observaram redução significativa de TBARS em comparação ao controle, porém maior efeito de inibição em alecrim (90,7%) do que BHT (76,3%), que apresentou-se similar a melissa (74,8%). Mesmo efeito foi detectado por Sánchez-Escalante et al. (2003), em que amostras com ácido ascórbico e o controle sofreram maior reação oxidativa em relação aos extratos de orégano, alecrim e borragem ($P < 0,01$) durante refrigeração, indicando um alto potencial antioxidante destes. Além disto, estudos comprovam a alta capacidade antioxidante de vegetais de folhas verdes relacionada com a presença de compostos fenólicos (KIM, CHO e HAN, 2013). Desta maneira, extratos ricos nestes constituintes podem agir como inibidores

da formação de radicais livres e quelantes de íons de transição (McBRIDE, HOGAN e KERRY, 2007), como também notado em resultados obtidos por Luo et al. (2007) na avaliação de extratos de ervas medicinais chinesas adicionados em carne crua de ovelha armazenada em bandejas de polietileno a 4°C.

Assim, diante aos resultados obtidos, pode-se afirmar que o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante do orégano *in vitro* apresentaram um efeito real nos hambúrgueres devido à inibição da oxidação lipídica em mesmo nível que o tratamento contendo BHT.

Além disto, conforme resultados, o processo de oxidação lipídica aumentou a descoloração das amostras controles, consequentemente às alterações na oximioglobina, sendo este comportamento também detectado por Zakrys et al. (2008), em estudos de parâmetros de qualidade em carne acondicionada sob atmosfera modificada com diferentes concentrações de O₂.

Figura 33 – Índice de TBARS em hambúrgueres de ovelha durante armazenamento a 2°C (n = 4).

Fonte: Própria autoria.

3.7 Evolução da oxidação de proteínas durante o armazenamento

As condições de armazenamento e embalagem apresentaram efeito considerável sobre a oxidação protéica, seguindo mesmo comportamento de TBARS, conforme pode ser visualizada na Figura 34. O teor de carbonilas aumentou significativamente para o tratamento controle ($P < 0,001$) ao longo do tempo, atingindo valor de $4,52 \pm 0,33$ nmol/mg de proteína aos 20 dias. Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas entre os tratamentos a partir do 5º até o último dia de armazenamento, sendo que após 20 dias, BHT e orégano demonstraram menor formação de carbonilas ($P < 0,05$), com valores respectivamente de $3,64 \pm 0,29$ e $3,14 \pm 0,15$ nmol/mg de proteína, ou seja, representando inibição de 20 a 30%, em comparação ao controle.

Figura 34 – Alterações de carbonilas em hambúrgueres de ovelha durante armazenamento a 2°C (n = 4).

Fonte: Própria autoria.

Jongberg et al. (2011) recentemente demonstraram que a formação de carbonilas protéicas foi significativamente menor em hambúrgueres bovinos contendo extrato de uva branca em relação ao controle, aos 9 dias sob diferentes atmosferas modificadas a 4°C. Os resultados do presente trabalho, também são

semelhantes aos de Jia et al. (2012), que avaliaram extrato de cassis adicionado em hambúrgueres suínos sob refrigeração. Neste caso, a inibição total ou parcial da oxidação protéica poderia evitar possíveis efeitos indesejáveis em carnes e produtos cárneos relacionados com a textura, capacidade de retenção de água e qualidade nutricional. Assim, os compostos fenólicos provavelmente protegeram a proteína retardando os principais fatores iniciadores da oxidação (fatores ambientais, metais de transição, mioglobina e lipídeos oxidantes), apresentando atividade anti radical livre (ESTÉVEZ, 2011).

3.8 Perfil dos ácidos graxos livres durante armazenamento

Os valores correspondentes aos ácidos graxos livres (AGL) entre 0 e 20 dias de armazenamento de hambúrgueres de ovelha podem ser visualizados na Tabela 24. Em geral, não foram observadas alterações significativas ($P>0,05$) durante o período de armazenamento para a maioria dos AGL, sendo que entre os tratamentos, o ácido linolênico foi o ácido essencial que apresentou menor valor no grupo controle em relação aos outros dois, indicando maior oxidação deste ($P<0,05$) aos 20 dias. Isto se justifica pela baixa estabilidade dos ácidos essenciais o que promove consequentemente uma maior susceptibilidade à degradação lipídica (HYGREEVA, PANDEY e RADHAKRISHNA, 2014; LEE et al., 2005).

Ao final do armazenamento, os AGMI foram encontrados em níveis mais elevados, seguidos por AGS e AGPI, sendo dentre os 25 compostos quantificados, oléico, palmítico e esteárico os ácidos graxos livres predominantes, assim como também detectados como principais em hambúrgueres bovinos elaborados com baixa taxa de gordura por Pennisi Forell et al. (2010). Tais resultados indicam que não houve nenhum efeito significativo ($P>0,05$) do extrato de orégano em relação aos outros tratamentos aos 20 dias, quanto às enzimas lipolíticas tanto do músculo quanto do tecido adiposo.

Tabela 24 – Efeitos de extratos naturais em ácidos graxos livres em hambúrgueres de ovelha nos dias 0 e 20 a 2°C (média±erro padrão). *(continua)*

Ácidos graxos livres	Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)		Sign.
		0	20	
Ácido mirístico (C14:0)	CO	1,48±0,08	1,42±0,06	n.s.
	BHT	1,15±0,11	1,59±0,35	n.s.
	ORE	1,35±0,14	1,55±0,31	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	
Ácido miristoléico (C14:1n5)	CO	0,33±0,04	0,50±0,14	n.s.
	BHT	0,39±0,08	0,54±0,03	n.s.
	ORE	0,35±0,01 ^a	0,51±0,00 ^b	**
	Sign.	n.s.	n.s.	
Ácido pentadecanóico (C15:0)	CO	0,30±0,00	0,33±0,04	n.s.
	BHT	0,22±0,05	0,19±0,01	n.s.
	ORE	0,24±0,02	0,18±0,03	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	
Ácido palmítico (C16:0)	CO	15,10±0,51	15,17±1,83	n.s.
	BHT	13,78±1,49	18,31±0,97	n.s.
	ORE	13,65±1,27	17,03±0,86	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	
Ácido palmitoléico (C16:1n7)	CO	1,85±0,19	1,84±0,14	n.s.
	BHT	1,46±0,09 ^a	2,26±0,20 ^b	*
	ORE	1,73±0,17	2,12±0,14	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	
Ácido heptadecanóico (C17:0)	CO	0,69±0,06	0,62±0,03	n.s.
	BHT	0,62±0,12	1,08±0,07	n.s.
	ORE	0,62±0,06	0,69±0,16	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	
Cis-10-ácido heptadecanóico (C17:1n7)	CO	0,43±0,07	0,64±0,25	n.s.
	BHT	0,48±0,12	0,71±0,06	n.s.
	ORE	0,46±0,04	0,63±0,04	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	
Ácido esteárico (C18:0)	CO	10,87±0,75	11,42±2,35	n.s.
	BHT	8,89±1,10	10,71±1,72	n.s.
	ORE	9,12±0,76	10,71±1,28	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	
Ácido eláidico (C18:1n9t)	CO	0,45±0,08	0,38±0,04	n.s.
	BHT	0,35±0,07	0,26±0,05	n.s.
	ORE	0,34±0,03	0,28±0,04	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	
Ácido trans-11-vacênico (C18:1n11t)	CO	1,50±0,24	1,46±0,15	n.s.
	BHT	1,69±0,42	2,16±0,73	n.s.
	ORE	1,45±0,18	1,89±0,61	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	

(continuação)

Ácidos graxos livres	Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)		Sign.
		0	20	
Ácido oléico (C18:1n9c)	CO	25,39±2,54	22,70±2,66	n.s.
	BHT	21,94±3,17	31,81±3,87	n.s.
	ORE	21,12±2,62	28,46±2,61	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	
Ácido cis-11-vacênico (C18:1n7c)	CO	1,26±0,11 ²	1,20±0,17	n.s.
	BHT	0,85±0,11 ¹	1,21±0,09	n.s.
	ORE	0,74±0,051 ^{a1}	1,29±0,13 ^b	*
	Sign.	*	n.s.	
Ácido linoleláidico (C18:2n6t)	CO	0,32±0,02	0,34±0,08	n.s.
	BHT	0,31±0,06	0,53±0,04	n.s.
	ORE	0,27±0,02	0,32±0,08	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	
Ácido linoléico (C18:2n6c)	CO	3,88±0,72	4,44±0,82	n.s.
	BHT	2,58±0,44	3,14±0,16	n.s.
	ORE	3,58±0,42	3,54±0,37	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	
Ácido araquídico (C20:0)	CO	0,17±0,03	0,19±0,04	n.s.
	BHT	0,07±0,01	0,14±0,05	n.s.
	ORE	0,14±0,04	0,16±0,04	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	
Ácido cis-11-eicosenóico (C20:1n9)	CO	0,55±0,15	0,96±0,29	n.s.
	BHT	0,53±0,19	1,09±0,09	n.s.
	ORE	0,83±0,04	1,00±0,01	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	
Ácido linolênico (C18:3n3)	CO	0,56±0,03	0,46±0,03 ¹	n.s.
	BHT	0,58±0,06 ^a	0,97±0,10 ^{b2}	*
	ORE	0,54±0,01 ^a	0,85±0,06 ^{b2}	**
	Sign.	n.s.	*	
Ácido cis-11,14-eicosadienóico (C20:2n6)	CO	0,15±0,01	0,15±0,05	n.s.
	BHT	0,11±0,03	0,12±0,02	n.s.
	ORE	0,11±0,05	0,16±0,02	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	
Ácido cis-8,11,14-eicosatrienóico (C20:3n6)	CO	0,13±0,01	0,15±0,02	n.s.
	BHT	0,12±0,03	0,09±0,04	n.s.
	ORE	0,14±0,02	0,18±0,02	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	
Ácido cis-11,14,17-eicosatrienóico (C20:3n3)	CO	0,40±0,00 ²	0,38±0,05	n.s.
	BHT	0,29±0,02 ¹	0,54±0,07	n.s.
	ORE	0,59±0,04 ³	0,57±0,11	n.s.
	Sign.	**	n.s.	
Ácido araquidônico (C20:4n6)	CO	0,52±0,15	0,16±0,15	n.s.

(conclusão)

Ácidos graxos livres	Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)		Sign.
		0	20	
Ácido tricosanóico (C23:0)	BHT	0,60±0,30	0,56±0,29	n.s.
	ORE	0,43±0,16	1,00±0,26	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	
	CO	0,07±0,01 ^a	1,14±0,08 ^{b2}	**
	BHT	0,06±0,00	0,05±0,01 ¹	n.s.
	ORE	0,07±0,01	0,06±0,00 ¹	n.s.
Ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (C20:5n3)	Sign.	n.s.	**	
	CO	0,16±0,02	0,16±0,01	n.s.
	BHT	0,15±0,03	0,20±0,51	n.s.
	ORE	0,17±0,03 ^a	0,26±0,02 ^b	*
Ácido docosapentaenóico (C22:5n3)	Sign.	n.s.	n.s.	
	CO	0,23±0,01	0,19±0,06	n.s.
	BHT	0,23±0,02	0,31±0,06	n.s.
	ORE	0,27±0,03	0,34±0,02	n.s.
Ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (C22:6n3)	Sign.	n.s.	n.s.	
	CO	0,18±0,10	0,25±0,08	n.s.
	BHT	0,19±0,08	0,22±0,04	n.s.
	ORE	0,27±0,08	0,32±0,07	n.s.
AGS	Sign.	n.s.	n.s.	
	CO	24,67±3,03	24,94±3,33	n.s.
	BHT	24,32±2,32	33,00±3,33	n.s.
	ORE	25,02±2,18	30,25±2,52	n.s.
AGMI	Sign.	n.s.	n.s.	
	CO	30,92±3,20	27,91±2,61	n.s.
	BHT	26,33±3,67	39,65±5,58	n.s.
	ORE	25,57±3,46	35,09±3,87	n.s.
AGPI	Sign.	n.s.	n.s.	
	CO	5,05±0,45 ^{1,2}	6,00±0,66	n.s.
	BHT	3,78±0,67 ¹	5,42±0,87	n.s.
	ORE	6,31±0,45 ²	6,24±0,48	n.s.
Ácidos graxos livres totais	Sign.	*	n.s.	
	CO	61,47±2,97	60,99±6,83	n.s.
	BHT	48,25±2,55	77,39±10,41	n.s.
	ORE	50,99±4,36	70,65±7,15	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	

Valores expressos em mg/g de lipídeos.

Tratamentos: CO = controle sem antioxidante, BHT = butil-hidroxitolueno 50 ppm e ORE = extrato de orégano 1000 ppm.

a,b,c,d,e: Valores médios na mesma linha (correspondente ao mesmo tratamento) não seguido de letra comum diferem significativamente ($P<0,05$).1,2,3: Valores médios na mesma coluna (correspondente ao mesmo tempo de armazenamento) não seguido por número comum diferem significativamente ($P<0,05$).Sign.= Significância: *** ($P<0,001$), ** ($P<0,01$), * ($P<0,05$), n.s. não significativo ($P\geq 0,05$) (n = 4).

Fonte: Própria autoria.

Contrariamente a este estudo, Reddy et al. (2013) observaram que produtos reestruturados de carne de cordeiro adicionados de extratos de semente de uva apresentaram menores valores de ácidos graxos livres em relação ao controle e BHA ($P < 0,05$) durante estocagem em condições aeróbias por 14 dias a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, possivelmente devido à atividade antimicrobiana que promoveu redução microbiológica e lipolítica e consequentemente menor geração de ácidos graxos livres.

3.9 Perfil dos compostos voláteis durante armazenamento

A análise de compostos voláteis proporciona uma diversidade de informações, especialmente quanto aos voláteis derivados de lipídeos. Entre os compostos originados durante a oxidação lipídica da carne e seus derivados, aldeídos é o grupo predominante (DOMÍNGUEZ et al., 2014).

Os compostos voláteis selecionados durante o armazenamento dos hambúrgueres de ovelha podem ser visualizados na Tabela 25, sendo que 1-pentanol foi um dos compostos encontrados em alto teor, assim como outros estudos com carne ovina (VASTA et al., 2012), porém, apesar disto, não apresentou diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos e ao longo do período avaliado.

Tabela 25 – Compostos voláteis em hambúrgueres de ovelha durante armazenamento a 2°C (média $\pm$ erro padrão). (continua)

Compostos voláteis	IRL	Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)		Sign.
			0	20	
<i>Álcool</i>		CO	55,80 $\pm$ 7,97	51,61 $\pm$ 13,20	n.s.
1-Pentanol	839	BHT	39,19 $\pm$ 8,46	43,97 $\pm$ 9,74	n.s.
		ORE	43,45 $\pm$ 3,51	28,48 $\pm$ 7,19	n.s.
<i>Cetona</i>		Sign.	n.s.	n.s.	
3-hidroxi-2-Butanona	776	CO	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	1073,45 $\pm$ 100,27 ^{b2}	***
		BHT	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	763,63 $\pm$ 22,45 ^{b1}	***
		ORE	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	1286,65 $\pm$ 118,78 ^{b2}	***
<i>Alcanos</i>		Sign.	n.s.	**	
Decano	1037	CO	12,74 $\pm$ 2,71	8,33 $\pm$ 1,16	n.s.

(conclusão)

Compostos voláteis	IRL	Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)		Sign.
			0	20	
Dodecano	1209	BHT	5,35±0,05 ^a	11,58±1,05 ^b	*
		ORE	14,64±2,84	13,50±2,35	n.s.
		Sign.	n.s.	n.s.	
		CO	10,68±0,22	9,39±2,53	n.s.
		BHT	12,93±1,64 ^b	7,82±0,68 ^a	*
		ORE	10,86±0,11	14,99±1,48	n.s.
3-metil-nonano	1009	Sign.	n.s.	n.s.	
		CO	9,49±1,71	7,47±1,00	n.s.
		BHT	9,25±0,57 ^b	6,45±0,79 ^a	*
		ORE	6,84±1,60	3,72±0,04	n.s.
		Sign.	n.s.	n.s.	
		CO	17,84±1,71 ²	13,58±1,76	n.s.
Aldeído Heptanal	978	BHT	8,10±0,77 ¹	14,27±2,91	n.s.
		ORE	7,65±0,89 ^{a1}	11,43±0,58 ^b	*
		Sign.	*	n.s.	
		CO	10,70±1,58 ^b	4,43±0,62 ^a	*
		BHT	15,06±0,48 ^b	4,72±0,31 ^a	**
		ORE	8,39±1,72	7,74±1,00	n.s.
Hidrocarbonetos 3-etil-heptano	902	Sign.	n.s.	n.s.	
		CO	48,10±5,77 ^a	113,86±2,48 ^{b2}	**
		BHT	40,77±7,86	26,78±3,91 ¹	n.s.
		ORE	40,89±2,59	32,68±1,16 ¹	n.s.
		Sign.	n.s.	***	
		CO	167,70±28,01 ^a	1393,59±119,42 ^{b2}	**
Octano	810	BHT	115,60±22,26 ^a	862,30±33,90 ^{b1}	***
		ORE	124,89±13,42 ^a	1285,57±100,77 ^{b2}	***
		Sign.	n.s.	**	
		CO	167,70±28,01 ^a	1393,59±119,42 ^{b2}	**
		BHT	115,60±22,26 ^a	862,30±33,90 ^{b1}	***
		ORE	124,89±13,42 ^a	1285,57±100,77 ^{b2}	***
Compostos voláteis totais		Sign.	n.s.	**	
		CO	167,70±28,01 ^a	1393,59±119,42 ^{b2}	**
		BHT	115,60±22,26 ^a	862,30±33,90 ^{b1}	***
		ORE	124,89±13,42 ^a	1285,57±100,77 ^{b2}	***
		Sign.	n.s.	**	
		CO	167,70±28,01 ^a	1393,59±119,42 ^{b2}	**

Resultados expressos em UA × 10⁶/g de amostra.

UA – unidades de área resultante da contagem cromatográfica iônica.

IRL: índices de Retenção Linear calculados em relação ao tempo de retenção do n-alceno (C₅–C₁₉).

Tratamentos: CO = controle sem antioxidante, BHT = butil-hidroxitolueno 50 ppm e ORE = extrato de orégano 1000 ppm.

^{a,b}: Valores médios na mesma linha (correspondente ao mesmo tratamento) não seguido de letra comum diferem significativamente ($P < 0,05$).

^{1,2}: Valores médios na mesma coluna (correspondente ao mesmo tempo de armazenamento) não seguido por número comum diferem significativamente ($P < 0,05$).

Sign.= Significância: *** ($P < 0,001$), ** ($P < 0,01$), * ($P < 0,05$), n.s. não significativo ($P \geq 0,05$) (n = 4).

Fonte: Própria autoria.

A presença de 3-hidroxi-2-butanona não foi detectada no dia zero, mas no 20º dia foi o principal composto volátil encontrado nos hambúrgueres ($P < 0,001$), sendo este um composto fortemente relacionado ao aroma associado à oxidação lipídica e degradação protéica (PHAM et al., 2008), que provavelmente foi o principal

responsável pela baixa aceitabilidade sensorial, conforme resultados obtidos para o atributo odor aos 20 dias. Octano foi significativamente menor ($P<0,001$) ao final do armazenamento para BHT e orégano em comparação ao tratamento controle, que sofreu aumento durante o período ($P<0,01$), já que este é um dos indicativos da ocorrência da oxidação, conforme confirmado em estudos de Luna, Morales e Aparicio (2006). Neste caso, este composto volátil foi identificado durante a indução de alterações por irradiação de óleo de oliva, formado a partir dos hidroperóxidos de ácido oléico, que foi um dos ácidos graxos detectado em maior abundância nos hambúrgueres do presente estudo.

A quantidade total dos compostos voláteis aumentou ao longo do tempo ($P<0,01$) para todos os tratamentos, estando de acordo com os valores de TBARS, que também apresentaram um aumento durante o período avaliado. Aos 20 dias de armazenamento observou-se que o tratamento contendo BHT apresentou menor valor significativo em comparação aos outros tratamentos, estando este comportamento altamente relacionado com resultados de avaliação sensorial de odor desagradável, que permaneceu com pontuações mais altas para controle e tratamento contendo extrato de orégano, sendo estes considerados menos aceitáveis. Mansour e Khalil (2000), também verificou alta relação entre voláteis totais e avaliação sensorial de odor, que aumentaram durante o tempo de estocagem de hambúrgueres bovinos e, aos 12 dias de refrigeração, a amostra controle apresentou maior rancidez em relação aos que continham antioxidantes naturais de semente de feno e de gengibre. Contrariamente ao presente estudo, Ganhão et al. (2013) observaram redução de compostos voláteis derivados de lipídeos, pela adição de extrato de bagas do Mediterrâneo em hambúrgueres suínos cozidos e mantidos sob refrigeração.

3.10 Estabilidade sensorial

Quanto à percepção sensorial, foram avaliados os atributos cor vermelha, descoloração da superfície e odor desagradável para os hambúrgueres de ovelha podendo os resultados finais serem visualizados na Figura 35 (A, B e C, respectivamente). No tempo inicial, não houve diferenças significativas ($P>0,05$)

entre os tratamentos para qualquer atributo, sendo estas perceptíveis somente após 10 dias de armazenamento ($P < 0,01$), iniciando-se pelo odor. Além disto, observou-se uma menor aceitação ao longo do período avaliado para todos os tratamentos e atributos ($P < 0,001$).

Quanto à cor vermelha, houve diferença significativa a partir de 15 dias, sendo que ao final do armazenamento, de acordo com a conversão das escalas utilizadas, o grupo controle permaneceu em média como “extremamente baixo”, enquanto que os outros dois grupos foram classificados entre “médio” e “moderadamente baixo” ($P < 0,001$). Neste caso, durante o período refrigerado, a perda significativa ($P < 0,001$) de cor vermelha foi visualmente perceptível para todos os tratamentos, porém com uma maior aceitação aos 20 dias para BHT e orégano em relação ao controle ($P < 0,001$).

A descoloração superficial também aumentou ao longo do tempo ($P < 0,001$) para todos os tratamentos, de "nada" (dia 0) para até "21-60%" ao final da estocagem. Aos 15 dias notou-se que as amostras controles apresentaram maior descoloração ($P < 0,001$), enquanto que aos 20 dias, BHT e orégano mantiveram tendências de melhores pontuações em relação ao controle, apesar do BHT ter apresentado significativamente um menor valor e conseqüentemente menor descoloração ($P < 0,01$), entre 11-20%.

Figura 35 – Efeitos do antioxidante natural na percepção sensorial de hambúrgueres de ovelha durante armazenamento a 2°C (n = 14).

Fonte: Própria autoria.

O odor durante o armazenamento alterou significativamente ($P < 0,001$) de “bom”, no tempo inicial, para “difícilmente aceitável/não aceitável”, podendo estar os tratamentos relacionados com a evolução de compostos voláteis totais, principalmente 3-hidroxi-2-butanona, já que no 20º dia o tratamento contendo BHT apresentou menor valor destes compostos ($P < 0,01$) e uma maior aceitabilidade quanto a este atributo avaliado ($P < 0,001$). Entretanto, em 15 dias de armazenamento os tratamentos contendo BHT e orégano apresentaram escores

médios mais altos ($P < 0,001$), “aceitáveis”, do que o tratamento controle, que foi avaliado em média como “difícilmente aceitável”.

A presença de extrato de orégano impediu a perda de qualidade sensorial em hambúrgueres de ovelha até 15 dias de armazenamento, em que os atributos apresentaram boa aceitabilidade, concordando com resultados obtidos para oxidação lipídica e protéica, que foram semelhantes aos tratamentos contendo BHT. As alterações no odor são consistentes com as contagens microbianas que indicaram a ocorrência de deterioração ao longo do tempo, a partir de 10 dias, não sendo aceitáveis microbiologicamente aos 15 dias. Das et al. (2011) avaliando o efeito da folha de curry em pó em hambúrgueres de carne de cabra, observaram declínio similar nas pontuações de cor e odor durante 9 dias, não apresentando efeito antimicrobiano durante a estocagem refrigerada. No entanto, no presente estudo, considerando-se os atributos sensoriais avaliados, o extrato natural apresentou resultados semelhantes ao tratamento contendo BHT, indicando uma possível equivalência até 15 dias. Resultados similares também foram encontrados por Chan et al. (2014), em produto cárneo emulsificado estocado sob refrigeração por 12 dias, elaborados com extrato aquoso desodorizado de canela e antioxidantes sintéticos (ácido ascórbico, BHT e BHA).

4 CONCLUSÃO

A adição de extrato de orégano apresentou efeito antioxidante em hambúrgueres de ovelha embalados sob ATM e armazenados a $2 \pm 1^\circ\text{C}$ e reduziu a oxidação lipídica e de proteínas. No entanto, a contagem microbiana, perfil de ácidos graxos livres e de compostos voláteis de oxidação lipídica foram pouco afetados e sensorialmente a estabilidade apresentou um limite de 15 dias, compatível ao BHT, apesar do tempo de vida útil de ambos os tratamentos ter sido limitado microbiologicamente em 10 dias. Estes resultados sugerem a aplicação do extrato natural como uma solução viável, similar ao antioxidante sintético, promovendo maior saudabilidade ao produto final, além da maior agregação de valor às carnes de baixo valor comercial.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y.-I.; SHETTY, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p.317-324, 2008.

ALBANO, S.M.; MIGUEL, M.G. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. **Industrial Crops and Products**, v.33, p.338-343, 2011.

ALMELA, L. et al. Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. **Journal of Chromatography A**, v.1120, p.221–229, 2006.

BALLARD, T.S. et al. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from peanut skins using response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.3064–3072, 2009.

BAÑÓN, S. et al. Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. **Meat Science**, v.77, p.626-633, 2007.

ARANHA, C.P.M.; JORGE, N. Antioxidant potential of oregano extract (*Origanum vulgare* L.). **British Food Journal**, v.114, p.6-7, 2012.

BRASIL. Instrução Normativa n.º 20, de 31 de julho de 2000. Dispõe sobre os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de hambúrguer. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília-DF, jul. 2000.

CARBONARA, T. et al. Phytochemical analysis of a herbal tea from *Artemisia annua* L. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.62, p.79–86, 2012.

CARPENTER, R. et al. Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork. **Meat Science**, v.76, p.604–61, 2007.

CASTILHO, P.C. et al. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. **Food Control**, v.23, p.552-558, 2012.

- CHAN, K.W. et al. Cinnamon bark deodorised aqueous extract as potential natural antioxidant in meat emulsion system: a comparative study with synthetic and natural food antioxidants. **Journal of Food Science and Technology**, v.51, p.3269–3276, 2014.
- CHOULIARA, E. et al. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4°C. **Food Microbiology**, v.24, p.607-617, 2007.
- COLINDRES, P.; BREWER, M.S. Oxidative stability of cooked, frozen, reheated beef patties: Effect of antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, p.963-968, 2011.
- DAS, A.K.; RAJKUMAR, V.; DWIVEDI, D.K. Antioxidant effect of curry leaf (*Murraya koenigii*) powder on quality of ground and cooked goat meat. **International Food Research Journal**, v.18, p.563–569, 2011.
- DAINTY, R.H.; MACKEY, B.M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. **The Journal of Applied Bacteriology**, v.73, p.103-114, 1992.
- DJENANE, D. et al. Ability of α -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. **Food Chemistry**, v.76, p.407-415, 2002.
- DOMÍNGUEZ, R. et al. Effect of different cooking methods on lipid oxidation and formation of volatile compounds in foal meat. **Meat Science**, v.97, p.223–230, 2014.
- DORMAN, H.J.D. et al. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, v.83, p.255-262, 2003.
- DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001, 676p.
- ESTÉVEZ, M. Protein carbonyls in meat systems: A review. **Meat Science**, v.89, p.259-279, 2011.

EXARCHOU, V. et al. Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Summer Savory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.5294–5299, 2002.

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

FERREIRA, E.L. et al. Natural antioxidant from yerba maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) prevents hamburger peroxidation. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, v.54, p.803-809, 2011.

GAWLIK-DZIKI, U. Dietary spices as a natural effectors of lipoxygenase, xanthine oxidase, peroxidase and antioxidant agents. *LWT - Food Science and Technology*, v.47, p.138-146, 2012.

FERNANDES, R.P.P. et al. Stability of lamb loin stored under refrigeration and packed in different modified atmosphere packaging systems. *Meat Science*, 96, 554-561, 2014.

GANHÃO, R.; MORCUENDE, D.; ESTÉVEZ, M. Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Science*, v.85, p.402-409, 2010.

GANHÃO, R. et al. Mediterranean berries as inhibitors of lipid oxidation in porcine burger patties subjected to cooking and chilled storage. *Journal of Integrative Agriculture*, v.12, p.1982-1992, 2013.

GARRIDO, M.D. et al. Effect of two different red grape pomace extracts obtained under different extraction system on meat quality of pork burgers. *LWT – Food Science and Technology*, v.44, p.2238–2243, 2011.

GUIMARÃES, R. et al. Infusion and decoction of wild German chamomile: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. *Food Chemistry*, v.136, p.947-954, 2013.

GUO, Y. et al. Effect of controlled atmospheres with varying O₂/CO₂ levels of the postharvest senescence and quality of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) florets. *European Food Research and Technology*, v.237, p.943-950, 2013.

HAYES, J.E. et al. Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties. **Meat Science**, v.84, p.613-620, 2010.

HOSSAIN, M.B. et al. Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 10576–10581, 2010.

HYGREEVA, D.; PANDEY, M.C.; RADHAKRISHNA, K. Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products. **Meat Science**, v.98, p.47–57, 2014.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specification for Foods – **Microorganisms in foods - Sampling for microbiological analysis**: principles and specific applications. Toronto: University of Toronto Press, 1986. 193p.

ISO (1993). **International standard 8586-1**. Sensory analysis. General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Part 1: selected assessors. Genève: International Organization for Standardization.

ISO (2006). **International standard 5496**. Sensory analysis. Methodology. Initiation and training of assessors in the detection and recognition of odours. Genève: International Organization for Standardization.

JELLINEK, G. **Sensory evaluation of food: theory and practice**. England: Ellis Horwood, 1985. 429p.

JENNINGS, B.H.; AKOH, C.C. Effectiveness of natural versus synthetic antioxidants in a rice bran oil-based structured lipid. **Food Chemistry**, v.114, p.1456–1461, 2009.

JIA, N. et al. Antioxidant activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on lipid and protein oxidation of pork patties during storage. **Meat Science**, v.91, p.533–539, 2012.

JONGBERG, S. et al. Effect of white grape extract and modified atmosphere packaging on lipid and protein oxidation in chill stored beef patties. **Food Chemistry**, v.128, p.276-283, 2011.

JOHNSON, J.J. Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. **Cancer Letters**, v.305, p.1-7, 2011.

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

KIOKIAS, VARZAKAS, T.; OREOPOULOU, V. In vitro activity of vitamins, flavonoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.48, p.78-93, 2008.

KIM, S-J, CHO, AR, HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. **Food Control**, v.29, p.112-120, 2013.

KROLL, J.; RAWEL, H.M. Reactions of plant phenols with myoglobin: influence of chemical structure of the phenolic compounds. **Journal of Food Science**, v.66, p.48-58, 2001.

LAGOURI, V.; GULDAS, M.; GURBUZ, O. In vitro antioxidant/free radical scavenging and antibacterial properties of endemic oregano and thyme extracts from Greece. **Food Science and Biotechnology**, v.20, p.1487–1493, 2011.

LAGOURI, V.; NISTEROPOULOU, E. Antioxidant properties of *O. Onites*, *T. vulgaris* and *O. basilicum* species grown in Greece and their total phenol and rosmarinic acid content. **Journal of Food Lipids**, v.16, p.484-498, 2009.

LARA, M.S. et al. Evaluation of two natural extracts (*Rosmarinus officinalis* L. and *Melissa officinalis* L.) as antioxidants in cooked pork patties packed in MAP. **Meat Science**, v.88, p.481–488, 2011.

LEE, S. et al. The effects of antioxidant combinations on color and lipid oxidation in n-3 oil fortified ground beef patties. **Meat Science**, v.70, p.683-689, 2005.

LEITÃO, M.F.F. Aspectos microbiológicos da carne. In: CASTILLO, C.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K. M. V. A. B.; MIYAGUSKU, L. **Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados**. São Paulo: Varela, 2003. 191p.

LIN, L.-Z.; HARNLY, J.M. Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). **Food Chemistry**, 120, 319–326, 2010.

LICINA, et al. Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. **Food Control**, v.33, p.498-504, 2013.

LIN, L.-Z. et al. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, 20, 361-369, 2007.

LINARES, M.B. et al. Chemical and sensory quality of lamb meat burgers from Manchego Spanish breed. **Food composition and analysis**, v.63, p.843-852, 2012.

LIU, A.-H. et al. Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1161, 170–182, 2007.

LORENZO, J. M. et al. Changes in physico-chemical, microbiological, textural and sensory attributes during ripening of dry-cured foal salchichón. **Meat Science**, v.90, p.194-198, 2012.

LORENZO, J.M. et al. Influence of natural extracts on shelf life of modified atmosphere-package pork patties. **Meat Science**, v.96, p.526–534, 2014.

LUND, M.N. et al. High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage. **Meat Science**, v.77, p.295-303, 2007.

LUO, H. et al. Antioxidant and antimicrobial capacity of chinese medicinal herb extracts in raw sheep meat. **Journal of Food Protection**, v.70, p.1440–1445, 2007.

LUKAS, B.; NOVAK, J. The complete chloroplast genome of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*). **Gene**, v.528, n.2, p.163-169, 2013.

LUNA, G.; MORALES, M.T.; APARICIO, R. Changes Induced by UV Radiation during Virgin Olive Oil Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p.4790-4794, 2006.

MA, Y. et al. Separation and characterization of phenolic compounds from dry-blanching peanut skins by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1356, p.64–81, 2014.

MARTINS, N. et al. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. **Food Chemistry**, v.158, p.73-80, 2014.

MANSOUR, E.H.; KHALIL, A.H. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application to ground beef patties. **Food Chemistry**, v.69, p.135-141, 2000.

MAKRI, M. Effect of oregano and rosemary essential oils on lipid oxidation of stored frozen minced gilthead sea bream muscle. **Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v.8, p.67-70, 2013.

McBRIDE, N.T.M.; HOGAN, S.A.; KERRY, J.P. Comparative addition of rosemary extract and additives on sensory and antioxidant properties of retail packaged beef. **International Journal of Food Science and Technology**, v.42, p.1201-1207, 2007.

MEILGAARD, M.C.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory Evaluation Techniques** (4th Edition). CRC Press, 2006. 448p.

MERKEN, H.M.; BEECHER, G. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Food Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.577-599, 2000.

MORAIS, S. et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p.315-320, 2009.

MOVILEANU, I. et al. Comparison of Dried Plum Puree, Rosemary Extract, and BHA/BHT as Antioxidants in Irradiated Ground Beef Patties. **International Journal of Food Science**, p.1-7, 2013.

MUELA, E. et al. Effect of gas packaging conditions on thawed Thunnus obesus Preservation. **Food Control**, v.46, p.217-224, 2014.

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

NTZIMANI, A.G.; GIATRAKOU, V.I.; SAVVAIDIS, I.N. Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4°C: microbiological and sensory evaluation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.11, p.187-196, 2010.

PAREJO, I. et al. Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography-negative electrospray ionization

tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 3679-3687, 2004.

PATSIAS, A. et al. Shelf-life of a chilled precooked chicken product stored in air and under modified atmospheres: microbiological, chemical, sensory attributes. **Food Microbiology**, v.23, p.423-429, 2006.

PEÑAS, E. et al. Chemical evaluation and sensory quality of sauerkrauts obtained by natural and induced fermentations at different NaCl levels from Brassica oleracea var. capitata cv. Bronco grown in eastern Spain. Effect of storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.3549-3557, 2010.

PENNISI FORELL, S.C. et al. Effect of type of emulsifiers and antioxidants on oxidative stability, colour and fatty acid profile of low-fat beef burgers enriched with unsaturated fatty acids and phytosterols. **Meat Science**, v.86, p.364-370, 2010.

PHAM, A.J. et al. Relationships between sensory descriptors, consumer acceptability and volatile flavor compounds of American dry-cured ham. **Meat Science**, v.80, p.728-737, 2008.

KRISHNAN, K.R. et al. Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.171, p.32-40, 2014.

REDDY, G.V.B. et al. Effects of grape seed extract on the oxidative and microbial stability of restructured mutton slices. **Meat Science**, v.95, p.288-294, 2013.

Regulation EC 2073/05, DOUE L338/1. (2005). Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. **Official Journal of the European Union**. L 338/1eL 338/26

RENERRE, M. Review: biochemical basis of fresh meat color. In: Proceedings of the 45th international congress of meat science and technology. Yokohama, Japan, p.344-352, 2000.

ROBBINS, R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.2866-2887, 2003.

RODRÍGUEZ-CARPENA, J.G.; MORCUENDE, D.; ESTÉVEZ, M. Avocado by-products as inhibitors of colour deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage. **Meat Science**, v.89, p.166-173, 2011.

ROJAS, M.C.; BREWER, M.S. Effect of natural antioxidants on oxidative stability of frozen, vacuum-packaged beef and pork. **Journal of Food Quality**, v.31, p.173-188, 2008.

SÁNCHEZ-ESCALANTE, A. et al. Antioxidant action of borage, rosemary, oregano, and ascorbic acid in beef patties packaged in modified atmosphere. **Journal of Food Science**, v.68, p.339-344, 2003.

SÁNCHEZ-RABANEDA, F. et al. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.18, p.553–563, 2004.

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

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

SHAN, N. et al. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, p.112-119, 2007.

SHAN, B. et al. Antibacterial and antioxidant effects of five spice and herb extracts as natural preservatives of raw pork. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, p.1879-1885, 2009.

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O. Sensitivity of Spoiling and Pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 37:527-532, 2006.

SPIRIDON, L.; BODIRLAU, R.; TEACA, C.-A. Total phenolic content and antioxidant activity of plants used in traditional Romanian herbal medicine. **Central European Journal of Biology**, v.6, p.388-396, 2011.

SUHAJ, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.531-537, 2006.

SUN, J. et al. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, v.12, p.679-693, 2007.

TAJIK, H. et al. Effectiveness of clove essential oil and grape seed extract combination on microbial and lipid oxidation characteristics of raw buffalo patty during storage at abuse refrigeration temperature. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.38, p.31-38, 2014.

TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, p.2707-2714, 2013.

TUSEVSKI, O. et al. Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. **Central European Journal of Biology**, v.9, p.888-900, 2014.

TUTTOLOMONDO, T. et al. Biomolecular characterization of wild sicilian oregano: phytochemical screening of essential oils and extracts, and evaluation of their antioxidant activities. **Chemistry & Biodiversity**, v.10, p.411-433, 2013.

VALLVERDÚ-QUERALT, A. et al. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. **Food Chemistry**, v.154, p.299-307, 2014.

VASTA, V. et al. Volatile compound profile of ewe's milk and meat of their suckling lambs in relation to pasture vs. indoor feeding system. **Small Ruminant Research**, v.105, p.16-21, 2012.

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

ZAKRYS, P.I. et al. Effects of oxygen concentration on the sensory evaluation and quality indicators of beef muscle packed under modified atmosphere. **Meat Science**, v.79, p.648-655, 2008.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.5165-5170, 2001.

ZHENG, Z.L. et al. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v.292, p.214-218, 2009.

CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se que é possível usar extrato de ervas aromáticas em substituição aos antioxidantes sintéticos na elaboração de produtos processados à base de carne ovina.

Verificou-se comportamentos similares nos sistemas (hambúguer – congelado/cru embalados sob sistema permeável aos gases e sob sistema de ATM, e linguiça – temperatura ambiente/cozida) frente aos diferentes parâmetros estudados e com adição de concentrações distintas de extrato de orégano. O ensaio de redução férrica foi o método em comum mais eficaz para estimar a quantidade adequada de antioxidante natural a ser adicionada em comparação ao eritorbato de sódio. Além disto, a incorporação de extrato de orégano permitiu estabilidade oxidativa similar aos antioxidantes sintéticos eritorbato de sódio e BHT, sem comprometer a aceitabilidade sensorial do produto.

Assim, é possível sugerir que extrato de orégano constitui em uma alternativa viável que favorece a estabilidade e maior saudabilidade aos produtos cárneos. Além disto, promove também o incentivo ao consumo de carne ovina, agregando valor ao produto final, desenvolvido com matéria-prima de baixo valor comercial, considerada menos nobre.

ANEXO 1

Termo de consentimento livre e esclarecido

Consentimento formal de participação no projeto de pesquisa: "Uso de extratos antioxidantes naturais obtidos de ervas aromáticas na elaboração de produtos a base de carne ovina".

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ CEP: _____ Fone: _____

Justificativa: A oxidação lipídica está relacionada a diversas propriedades organolépticas, como aroma, coloração, textura, suculência, estabilidade das proteínas e vida de prateleira. A presença de antioxidantes retarda 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 do antioxidante entorbató de sódio em hambúrguer a base de carne ovina.

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 do hambúrguer.
- Serão testadas formulações de hambúrguer com diferentes extratos antioxidantes.
- 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 produtos cárneos, nos quais os provadores experimentarão os produtos desenvolvidos serão acompanhados pela aluna proponente (Rafaela de Paula Paseto Fernandes).

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

Eu, _____, RG _____

_____, CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo "Uso de extratos antioxidantes naturais obtidos de ervas aromáticas na elaboração de produtos a base de carne ovina".

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 à 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: Rafaela de Paula Paseto Fernandes – Doutoranda - Engenharia de Alimentos.
Contato: rafaelpaseto@usp.br

Pirassununga, _____ de _____ de _____. Assinatura: _____

ANEXO 2

Laboratorio de Análisis Sensorial - CTC																																						
Nombre: _____		Fecha: _____																																				
Producto: Linguiza cocida - oveja																																						
<p>Instrucciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Vas a recibir cuatro muestras; una muestra control identificada con la letra C, y tres muestras problema identificadas con un número de tres cifras. Una de estas muestras es un duplicado de la muestra control. - Prueba la muestra C que corresponde al control. - A continuación prueba las muestras problema en el orden indicado abajo, de izquierda a derecha. <div style="text-align: center; margin: 10px 0;"> <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30px; height: 20px;"></td> <td style="width: 30px; height: 20px;"></td> <td style="width: 30px; height: 20px;"></td> </tr> </table> </div> <p>- Valora la diferencia sensorial global entre cada una de las muestras problema y la muestra control usando la siguiente escala:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">Escala</th> <th colspan="3" style="width: 50%;">Muestras</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>No hay diferencia</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Hay una pequeña diferencia</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Hay una pequeña/moderada diferencia</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Hay una moderada diferencia</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Hay una moderada/gran diferencia</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Hay una gran diferencia</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Hay una diferencia muy grande</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p style="font-size: small; margin-top: 5px;">Marca con una X la opción elegida</p>							Escala	Muestras			No hay diferencia				Hay una pequeña diferencia				Hay una pequeña/moderada diferencia				Hay una moderada diferencia				Hay una moderada/gran diferencia				Hay una gran diferencia				Hay una diferencia muy grande			
Escala	Muestras																																					
No hay diferencia																																						
Hay una pequeña diferencia																																						
Hay una pequeña/moderada diferencia																																						
Hay una moderada diferencia																																						
Hay una moderada/gran diferencia																																						
Hay una gran diferencia																																						
Hay una diferencia muy grande																																						
<p>Observaciones:</p>																																						

ANEXO 3

Laboratorio de Análisis Sensorial - CTC			
Nombre: _____		Fecha: _____	
Producto: Lingüiça cocida - oveja			
<p>Instrucciones:</p> <p>- Vas a recibir seis muestras; una muestra control identificada con la letra C, y cinco muestras problema identificadas con un número de tres cifras. Una de estas muestras es un duplicado de la muestra control.</p> <p>- Valora la diferencia sensorial visual entre cada una de las muestras problema (de izquierda a derecha) y la muestra control usando la siguiente escala:</p>			
Escala	Muestras		
No hay diferencia			
Hay una pequeña diferencia			
Hay una pequeña/moderada diferencia			
Hay una moderada diferencia			
Hay una moderada/gran diferencia			
Hay una gran diferencia			
Hay una diferencia muy grande			
<small>Marca con una X la opción elegida</small>			
<p>Observaciones:</p>			