Caroline Ceribeli

Metabólitos Polares e a Estabilidade REDOX em Carne de
Frangos Suplementados com Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

Versão Revisada

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciências.

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

São Carlos

2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Oscar Roberto Ceribeli e Maria Rita Strabelli Ceribeli, por todo amor e dedicação.

À minha irmã Bianca Ceribeli, por todo carinho.

Ao meu namorado Henrique Ferraz de Arruda, grande incentivador de minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela concessão de saúde física e mental para que pudesse efetuar a realização deste trabalho.

Aos meus pais e minha irmã por minha formação como pessoa, por todo o apoio moral e financeiro.

Ao meu namorado Henrique Ferraz de Arruda, que é parte fundamental neste processo, pela credibilidade em minha pessoa, pelo apoio moral e científico e, principalmente, pela cumplicidade e incentivo em seguir com meus objetivos.

Ao meu amigo Gefferson do Amaral, que sempre me mostrou que a insatisfação é a porta para a busca de conhecimento e construção de seus próprios caminhos, e que, o conformismo e a comodidade, nem sempre são sinônimos de felicidade.

Ao Sr. Ivan Ferrari pela amizade, alegria e pelos momentos de renovação de energias necessárias ao prosseguimento e conclusão de minhas atividades.

A todos os meus amigos e pessoas que em sua genuína sinceridade acreditaram em mim.

A todos os que duvidaram, pois se tornaram o combustível necessário para que se desse a superação.

As agências de fomento Fapesp e Capes.

À Embrapa pela disponibilização de bolsa, infra-estrutura e material.

Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) e à Universidade de São Paulo (USP).

Ao professor Dr. Daniel Rodrigues Cardoso pela dedicação e orientação.

Ao professor Dr. Luiz Alberto Colnago da Embrapa.

A todos os meus amigos, em especial aos meus amigos de laboratório e à Andressa de Zawadzki, pela paciência e ajuda com meu trabalho.

A todos os funcionários da USP e em especial, do IQSC: técnicos, pessoas da seção administrativa, biblioteca, portaria, vigilância, serviços de limpeza, café, etc.

EPÍGRAFE

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”.

Charles Chaplin

RESUMO

A alimentação humana necessita de nutrientes essenciais em sua dieta de forma balanceada. A carne é uma perfeita fonte de proteína e suplemento de ferro, zinco e outros micronutrientes como as vitaminas. O consumo de carne deve ser cada vez maior, já que a produção mundial que em 2012 era de 302 milhões de toneladas, hoje é de aproximadamente 319 milhões. Concomitantes ao aumento no consumo mundial de carne surgem dois problemas. A carne e produtos cárneos induzem ao estress oxidativo, por meio do ferro catalizado na formação de espécies reativas ou por ingestão de hidroperóxidos orgânicos durante a digestão. Tais espécies podem acarretar deterioração do produto, afetando seu tempo de exposição em prateleira e comprometendo sua qualidade, interferindo em questões econômicas. Dentro de um contexto de saúde pública, estas espécies podem gerar desequilíbrio celular, mutações genéticas e danos cromossômicos, desencadeando doenças degenerativas no organismo humano. Uma dieta balanceada deve ser inspirada na natureza. Por meio da evolução as plantas desenvolveram, devido ao estress oxidativo, a capacidade de produzir compostos bioativos como xantinas e compostos fenólicos, como mecanismo de proteção. A Erva-mate, *Ilex paraguariensis* contém alta quantidade relativa destes compostos, que atuam como antioxidantes, os quais podem ser usados como aditivos na alimentação, com o objetivo de modificar o estado redox do organismo animal. Isto pode induzir mudanças no metabolismo, afetando a composição do tecido muscular e, conseqüentemente, a qualidade da carne. O presente trabalho se propôs a investigar as mudanças no perfil de composição dos metabólitos polares e seu impacto na estabilidade redox da carne de frangos de corte que tiveram suas dietas suplementadas com diferentes níveis de extrato de erva-mate na ração. A adição de tais extratos claramente promoveu uma mudança quantitativa na composição de metabólitos polares da carne como mostrado a partir de análises de RMN de ^1H e impactou positivamente na estabilidade redox segundo análises por *spin-trapping* RPE. Por fim, a adição de 750 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração na alimentação de frangos de corte mostrou-se como o tratamento mais indicado, promovendo mudanças bioquímicas no metabolismo do animal, melhorando a estabilidade oxidativa da carne, seu tempo de exposição em prateleira e um produto de maior qualidade e segurança para o consumidor.

ABSTRACT

Human food needs to supply essential nutrients in balance. Meat is a perfect protein source and supplies iron and zinc and many micronutrients like vitamins. The consumption of meat would increase in the next years because the global production in 2012 was 302 millions of tons, and actually is 319 millions of tons, approximately. Concomitantly with the increasing of global consumption of meat, two problems arise. Meat and meat products also hold the risk of inducing oxidative stress through iron catalyzed formation of reactive species or by ingestion of organic hydro peroxides during digestion. These species can cause the deterioration of the product, affecting its shelf-life, compromising its quality and influencing economic aspects. In the context of the public health, these species can generate cellular imbalance, genetic mutations, and chromosome damages, resulting in degenerative diseases of the human organism. A balanced diet should be inspired by Nature. Through evolution, oxidative stress made plants to produce bioactive compounds like xanthines and phenolic compounds to protect against oxidative stress. Yerba-mate, *Ilex paraguariensis*, contains relative high amounts of these compounds that act as antioxidants, which may be use as a feeding additive in order to modify the redox status of the animal organism. This may induce change in the animal metabolism, affecting the muscle tissue composition and thus the meat quality. The present investigation aims to screen changes in the polar metabolites composition and its impact on the redox stability of meat from broilers fed with different levels of yerba-mate extract as feed additive. The addition of mate extract to broilers feed clearly provided a quantitative change in the polar metabolites of meat as shown by ^1H NMR analysis and impacted positively in the redox stability of meat as probed by spin-trapping EPR analysis. In conclusion, addition of 750 mg of yerba-mate extract/ Kg of feed to the broilers shown up like the best treatment because it produced biochemical changes in the animal metabolism improving the oxidative stability meat which may positively increase the product shelf-life and a safer and higher quality product to the consumer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das partes em que se classifica a carne de frango.....20

Figura 2 - Tumorigênese e o papel da inflamação no desenvolvimento do câncer. ROS = espécies reativas de oxigênio; RNS = espécies reativas de nitrogênio; NO = óxido nítrico; PGs = prostaglandinas; ODC = ornitina descarboxilase; MMP = matriz metaloproteinase; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular.....25

Figura 3 – Principais fontes de oxidantes e radicais livres e seus papéis patofisiológicos.....26

Figura 4 – Distribuição eletrônica dos elétrons para os átomos de oxigênio em orbitais atômicos e para a molécula de O₂ em orbitais moleculares.....27

Figura 5 – Processos envolvidos na produção de radicais.....29

Figura 6 – Estruturas químicas das moléculas de a) PBN, b) 4-POBN e c) MNP que atuam como armadilhas químicas.....30

Figura 7 – Reações entre armadilhas químicas e radicais; a) Reação genérica entre uma nitrona e um radical; b) Reação exemplo entre a nitrona (PBN) e um radical; c) Reação genérica entre um composto nitroso e um radical; d) Reação exemplo entre um composto nitroso (MNP) e um radical.....31

Figura 8 – Árvore (a), folhas (b) e frutos (c) referentes a Erva-mate (*Ilex paraguariensis*).....33

Figura 9 - Estruturas químicas das moléculas de algumas metilxantinas; (a) cafeína, (b) teobromina e (c) teofilina.....34

Figura 10 - Estruturas químicas das moléculas de algumas saponinas; (a) ácido ursólico e (b) ácido oleanólico.....	34
Figura 11 - Estruturas químicas das moléculas de alguns compostos fenólicos; (a) ácido clorogênico; (b) rutina e (c) luteolina.....	35
Figura 12 – Relação entre as áreas proteômica, transcriptômica, metabolômica e foodômica.....	38
Figura 13 – Representação simplificada do fenômeno de RMN. B_0 e B_1 são o campo magnético constante e oscilante, respectivamente; μ a magnetização referente a cada núcleo; μ_{Total} referente à soma vetorial das magnetizações; J_{ab} e J_{ba} referem-se as constantes de acoplamento hiperfino e as letras a e b destacam os núcleos de H submetidos a diferentes ambientes eletrônicos e magnéticos.....	43
Figura 14 – Ilustração da visão do elétron e do núcleo através da técnica de RMN e RPE. Em (a) tem-se o referencial centrado no núcleo, em (b) tem-se o referencial centrado no elétron.....	44
Figura 15 – Representação simplificada do fenômeno de RPE. B corresponde ao campo magnético aplicado; m trata-se do número quântico direcional que é determinado por $\pm I$; $h \cdot \nu$ corresponde à energia; A_N e A_H são referentes as interações hiperfinas do spin do elétron do Nitrogênio com o spin de seu núcleo e do spin do elétron do Nitrogênio com o spin do núcleo de seu vizinho, respectivamente e g caracteriza o fator giromagnético.....	46
Figura 16 - Especificação dos tratamentos aos quais os frangos foram submetidos na dieta.....	50
Figura 17 – Representação da sequência de pulso Presat efetuada pelo equipamento de RMN.....	52

Figura 18 – Esquema ilustrativo das etapas desde o tratamento dos animais até o tratamento dos dados, referente às análises via RMN.....	54
Figura 19 – Esquema ilustrativo das etapas desde o tratamento dos animais até o tratamento dos dados, referente às análises via RPE.....	57
Figura 20 – Espectros de RMN de ^1H com uma amostra de frango do T1 – 0 mg de antioxidantes/ Kg de ração (espectro (a) em azul) e uma amostra do T6 – 1000 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração (espectro (b) em marrom), ambas do grupo denominado por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento).....	58
Figura 21 - Espectros de RMN de ^1H de uma amostra de frango do T1 – 0 mg de antioxidantes/ Kg de ração (espectro (a) em azul) e uma amostra do T6 – 1000 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração (espectro (b) em marrom), ambas do grupo denominado por Frango 7 dias (com tempo de armazenamento).....	59
Figura 22 - Espectro de ^1H de RMN referente a uma amostra do T1 – 0 mg de antioxidantes/ Kg de ração, com atribuição dos sinais.....	59
Figura 23 – Gráficos das PCAs referentes ao tratamento dos dados dos espectros de RMN dos animais do grupo denominado por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento); (a) PCA1 x PCA2; (b) PCA1 x PCA3 e (c) PCA1 x PCA2 x PCA3.....	70
Figura 24 – Gráficos de aranha referentes aos tratamentos de T1 a T6 para o grupo denominado por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento) feitos a partir dos dados obtidos com o método do ganho de informação. Unidades do gráfico para os sinais em ppm com sentido de prioridade anti-horário; intensidade do sinal no sentido radial.....	71

Figura 25 – Gráfico de loadings referente aos metabólitos de maior contribuição para a PC1; dados do grupo denominado por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento).....	74
Figura 26 – Gráfico de loadings referente aos metabólitos de maior contribuição para a PC2; dados do grupo denominado por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento).....	75
Figura 27 – Gráfico de loadings referente aos metabólitos de maior contribuição para a PC3; dados do grupo denominado por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento).....	76
Figura 28 – Gráficos das PCAs referentes ao tratamento dos dados dos espectros de RMN dos animais do grupo denominado por Frango 7 dias (com tempo de armazenamento); (a) PCA1 x PCA2; (b) PCA1 x PCA3 e (c) PCA1 x PCA2 x PCA3.....	77
Figura 29 – Gráficos de aranha referentes aos tratamentos de T1 a T6 para o grupo denominado por Frango 7 dias (com tempo de armazenamento) feitos a partir dos dados obtidos com o método do ganho de informação. Unidades do gráfico para os sinais em ppm com sentido de prioridade anti-horário; intensidade do sinal no sentido radial.....	78
Figura 30 – Gráfico de loadings referente aos metabólitos de maior contribuição para a PC1; dados do grupo denominado por Frango 7 dias (com tempo de armazenamento).....	80
Figura 31 - Gráfico de loadings referente aos metabólitos de maior contribuição para a PC2; dados do grupo denominado por Frango 7 dias (com tempo de armazenamento).....	81

Figura 32 – Gráfico de loadings referente aos metabólitos de maior contribuição para a PC3; dados do grupo denominado por Frango 7 dias (com tempo de armazenamento).....	82
Figura 33 – Espectros de RPE de uma amostra de frango do T1 – 0 mg de antioxidantes/ Kg de ração (a) e uma amostra do T6 – 1000 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração (b), ambas do grupo denominado por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento).....	83
Figura 34 – Reação do spin trapping PBN com uma espécie radical formando uma espécie aduto radical.....	83
Figura 35 – Espectros de RPE de uma amostra de frango do T1 – 0 mg de antioxidantes/ Kg de ração (a) e uma amostra do T6 – 1000 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração (b), ambas do grupo denominado por Frango 7 dias (com tempo de armazenamento).....	84
Figura 36 – Gráfico da taxa relativa de formação de radicais para os animais de T1 a T6 do grupo denominado por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento). Os pontos representam os dados reais e as linhas tracejadas representam as curvas que descrevem as funções ajustadas de acordo com cada perfil de pontos reais.....	85
Figura 37 - Gráfico da taxa relativa de formação de radicais para os animais de T1 a T6 do grupo denominado por Frango 7 dias (com tempo de armazenamento). Os pontos representam os dados reais e as linhas tracejadas representam as curvas que descrevem as funções ajustadas de acordo com cada perfil de pontos reais.....	85
Figura 38 – Esquema representativo do ciclo de autooxidação para reações em cadeia envolvendo radicais e rota alternativa com uso de PBN resultando em reação consecutiva.....	86

Figura 39 – Resumo da reação consecutiva que se desenvolve devido adição do PBN.....	87
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Algumas das Principais Espécies Reativas Existentes.....	28
Tabela 2 - Descrição das fórmulas químicas estruturais e demais parâmetros de RMN dos metabólitos identificados na carne de frango.....	61
Tabela 3 – Valores obtidos para as constantes de velocidade observadas referentes cada tratamento; dados referentes aos grupos de animais denominados por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento) e Frango 7 dias (com tempo de armazenamento).....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina trifosfato

ADP – Adenosina difosfato

AMP – Adenosina monofosfato

BCAA – Branched Chain Amino Acids

Beam Project – (do inglês: *Bread and Meat for the Future*) = Projeto Pão e Carne para o Futuro

DBNBS - 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenosulfonato

DEPMPO - 5-(dietoxifosforil)-5-metil-1-pirrolina-N-óxido

DFD - (do inglês: *dark, firm and dry*) = escura, firme e seca

DMPO - 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

D₂O – Óxido de Deutério

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPR – Electron Paramagnetic Resonance

ESALQ-USP - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, campus Piracicaba

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FID – (do inglês: *Free Induction Decay*) = Decaimento Livre de Indução

FT – (do inglês: *Fourier Transform*) = Transformada de Fourier

IMP - inosina 5'-monofosfato

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MNP - 2-metil-2-nitrosopropano

MES - Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico

MS – Espectrometria de Massas

NB - Nitrosobenzeno

NMR – Nuclear Magnetic Resonance

PBN - N-tert-butil- α -fenilnitrona

PCA - Principal Component Analysis

4-POBN – N-tert-butil- α -4-piridil-1-óxido nitrona

PSE - (do inglês: *pale, soft and exudative*) = pálida, mole e exsudativa

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RNS – (do inglês: *reactive nitrogen species*) = Espécies Reativas de Nitrogênio

ROS - (do inglês: *reactive oxygen species*) = Espécies Reativas de Oxigênio

RPE – Ressonância Paramagnética de Elétrons

TMS – Tetrametilsilano

TMSP-d4 – ácido 3-(trimetilsilil)-3,3,2,2-tetradeutério-propiónico

UnB - Universidade de Brasília

UPLC-HRESI-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e uso de fonte eletrospray operando no modo de detecção de íon negativo

SUMÁRIO

Sumário

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Panorama do Consumo de Carne no Brasil e no Mundo	19
1.2 A Carne de Frango	20
1.3 Composição Química da Carne	20
1.4 Problemas de Saúde Pública Associados ao Alto Consumo de Carne	24
1.5 Espécies Reativas	25
1.6 Os antioxidantes	32
1.7 Ilex paraguariensis (erva-mate)	32
1.8 Ciências ômicas: Metabolômica e Foodômica	35
1.9 Metabolômica Alvo e Metabolômica sem Alvo	38
1.10 Ressonância Magnética Nuclear	39
1.11 Ressonância Paramagnética de Elétrons e o estudo de estabilidade oxidativa 44	
2 DESENVOLVIMENTO	48
2.1 Objetivos gerais	48
2.2 Objetivos específicos	48
2.3.1. Extrato de Erva-Mate	48
2.3.2. Animais e dieta	49
2.3.3. Extração de Metabólitos Polares na Carne de Frango para Análise via RMN	51
2.3.4. Preparo de Soluções de Padrões para Análise via RMN	51
2.3.5. Análises via RMN	52
2.3.6. Processamento dos Dados de RMN e Identificação dos Metabólitos	52

2.3.7. Análises Multivariadas.....	53
2.3.8. Preparo das Amostras de Carne de Frango para Análise via RPE	55
2.3.9. Análises via RPE.....	55
2.3.10. Tratamento dos Dados de RPE.....	55
2.3.11. Análises das Taxas de Formação de Radicais	55
2.4. Resultados e Discussão	58
2.4.1. Ressonância Magnética Nuclear.....	58
2.4.2. Identificação dos metabólitos	59
2.4.3. Análises Multivariadas.....	69
2.4.4. Ressonância Paramagnética de Elétrons	82
2.4.5. Taxas de Formação de Radicais.....	84
3 CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS	94
APÊNDICE A – Espectros de RMN e RPE	108
APÊNDICE B – Tabela com descrição das dietas administradas para os animais	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 Panorama do Consumo de Carne no Brasil e no Mundo

Como consequência da elevada taxa de crescimento da população mundial, aliada à crescente demanda por carne nos países subdesenvolvidos, espera-se que cada vez mais se observe um aumento no consumo deste produto. A produção de carne que em 2012 consistia em 302 milhões de toneladas hoje já representa aproximadamente 319 milhões de toneladas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2012, 2015).

Esta tendência pode ser confirmada acompanhando-se por exemplo, os dados apresentados em 2012 face aos mais recentes. Naquele ano, projeções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (2012) e estudos realizados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (2012), inferiram um aumento na produção brasileira de carnes de frango, bovina e suína de até 30% para a próxima década. Portanto, a produção que no referido período era de 24,6 milhões de toneladas por ano, tende a crescer para 31,2 milhões de toneladas até 2022. Ainda neste contexto, de acordo com o MAPA, as expectativas são que antes de 2020, o Brasil se torne responsável pela produção de 44,5% do total do comércio de exportação do mercado internacional (FAO, 2012, 2015; MAPA, 2016). A carne de frango que atualmente é produzida na escala de 12,86 milhões de toneladas provavelmente liderará esta produção, representando aproximadamente 48% destas exportações (FAO, 2015; MAPA, 2016).

Isto confirma um fenômeno que vem sendo observado nos últimos 30 anos, o aumento significativo do mercado de aves no Brasil e no mundo. Desde frango, produto cuja exportação o faz chegar a 142 países, a aves como peru e avestruz, levam ao alto índice de crescimento e diversificação do agronegócio (MAPA, 2016). Neste tocante, produtos cárneos são de extrema importância tanto para o mercado interno como externo, uma vez que 70% da carne de frango produzida no Brasil é consumida internamente. Os 30% restantes são as remessas de exportação que representam 40% do total da demanda mundial (MAPA, 2016).

Com base em tais estimativas, nos próximos anos, o Brasil pode se consagrar como o maior exportador de carnes no mundo, assumindo um importante papel no comércio mundial.

1.2 A Carne de Frango

Na figura 1 tem-se a descrição das principais partes em que se classifica a carne de frango.

Figura 1 – Representação das partes em que se classifica a carne de frango.

Fonte: Hille, 2016. Com permissão de Hille Carnes.

O aumento populacional, aliado à crescente mudança nos hábitos alimentares e o aumento da renda propiciando maior poder aquisitivo nos países subdesenvolvidos, proporcionam cada vez mais, um aumento no consumo de alimentos de origem animal, tal como leite, ovos e mesmo a carne (BARBOSA, 2016.). O aspecto mais relevante associado ao consumo da carne de frango pode ser descrito por sua boa relação custo-benefício, uma vez que se trata de uma proteína de baixo valor agregado e que possui ricos valores nutricionais, uma vez que é uma carne mais saudável se comparada à carne vermelha, com menor teor de gordura.

1.3 Composição Química da Carne

A carne magra em geral, apresenta composição química de aproximadamente 75% de água, 21 a 22 % de proteína, 1 a 2 % de gordura, em torno de 1% de sais minerais e vitaminas e menos de 1% de carboidratos (ROÇA, 2012; HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2005).

A água é o componente presente em maior concentração na carne, seu teor é, inclusive, inversamente proporcional à quantidade de gordura. Devido sua presença

elevada, a água é considerada um dos parâmetros de influência da qualidade da carne, como cor, sabor, textura, aroma, etc (ROÇA, 2012; ABREU, 2014).

As proteínas presentes no tecido muscular se subdividem em: sarcoplasmáticas, miofibrilares e estromáticas. A primeira classe corresponde às proteínas solúveis, formadas principalmente por enzimas e mioglobina, numa proporção de aproximadamente 30% do total de proteínas. A segunda corresponde a 55% do total e é constituído principalmente por miofilamentos de actina e miosina. A terceira, com 10% a 15% do total, representa as proteínas insolúveis, que possuem em sua composição principalmente colágeno e elastina (FARIA, 2007; ZEOLA, 2002; PRATA, 1999).

Os lipídeos constituem elevado conteúdo energético, abrangendo ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis como A, D, E e K. No caso das carnes de aves, ocorre predominância de ácidos graxos insaturados (ROÇA, 2012). Segundo Faria (2007) e os pesquisadores Judge, Aberle e Forrest (1989), a gordura é um dos fatores que confere suculência, maciez e aroma à carne sendo, portanto, um componente também importante.

Além das vitaminas lipossolúveis já citadas, sendo as que figuram na carne em maior proporção as vitaminas A e E, há também a presença das vitaminas hidrossolúveis, como a vitamina C e vitaminas do complexo B. Estas somam a sua maior contribuição, sendo a carne junto a outros produtos de origem animal, uma das maiores fontes de vitaminas B₆ e B₁₂ (PEARSON; DUTSON, 1994).

Os sais minerais encontram-se presentes no tecido muscular, distribuindo-se entre o sarcoplasma (40%), parte nos componentes celulares (20%) e (40%) nos líquidos extracelulares. Os presentes de maneira mais relevante são: potássio, sódio, fósforo, cloro, magnésio, cálcio e ferro, este, de importante atividade na síntese da hemoglobina, mioglobina e enzimas. Secundariamente, cobre, manganês, zinco, molibdênio, cobalto e iodo (ZEOLA, 2002; PRATA, 1999). Os sais minerais são essenciais, uma vez que mantêm a neutralidade de tecidos e líquidos orgânicos, além de regularem a atividade muscular e nervosa, participando, inclusive, no processo de transformação do músculo em carne (FARIA, 2007; JUDGE; ABERLE; FORREST, 1989).

A carne possui baixo teor de carboidratos, basicamente polissacarídeos como o glicogênio e monossacarídeos como a glicose e frutose. A quantidade de glicogênio

depende do tipo do músculo e atividade que o animal desempenha, variando desde 1,5% quando o animal está vivo, até 0,1% após as modificações *post-mortem* (após a morte). Os carboidratos também contribuem com o odor e sabor característicos de carne, quando do preparo deste alimento (ROÇA, 2012).

1.3 Aspectos Sensoriais Ligados à Qualidade da Carne

Há diversas características físico-químicas e atributos de palatabilidade que influenciam na qualidade da carne, bem como na aceitação da mesma pelo consumidor. Dentre eles, destacam-se os parâmetros cor, aroma, sabor e maciez, suculência ou capacidade de retenção de água e pH (FARIA, 2007).

A cor talvez seja o primeiro e principal quesito do consumidor no momento da compra de um produto como a carne. Trata-se de importante atrativo visual que, no entanto, muitas vezes é erroneamente tido como sinônimo de frescor. Na carne, encontra-se a mioglobina, pigmento do qual decorre a sua coloração avermelhada característica. Esta cor, bem como decorrentes alterações sofridas pela mesma, tem relação com a presença da molécula de oxigênio ligada ao íon complexo de ferro nas proteínas da carne, e o respectivo estado de oxidação deste (LIBARDI, 2014).

O *flavour* (combinação entre aroma e gosto) característicos da carne são atribuídos tanto à presença de gorduras, como de carboidratos e proteínas, e a sua manutenção possui relação com a atividade de enzimas e reações químicas após o período de *post-mortem*. No caso das gorduras, enzimas lipolíticas em combinação com reações redox podem levar a rancidez. Durante o processo de putrefação da carne, enzimas óxido-redutases e reações de oxidação promovem a decomposição de substâncias nutritivas, acarretando na formação de substâncias de odor e sabor desagradáveis (ROÇA, 2012).

Sabor e maciez são também parâmetros importantes na escolha do consumidor de carne no momento da compra. No entanto, trata-se de um fator dependente de outros fatores indiretos como efeito de exercícios, sexo, idade, teor de gordura intramuscular, espessura da capa de gordura externa, espécie e variação de corte de um músculo para outro (ROÇA, 2012).

Outro quesito, denominado por suculência ou tecnicamente, capacidade de retenção de água, tem a ver com o fato de que a uma carne seca, associa-se perda de atributos palatáveis como os previamente citados, com diminuição de seu sabor e

cheiro e aumento de sua rigidez (PEARSON; DUTSON, 1994). A solubilidade das proteínas que compõem a carne consiste no principal fator de determinação de suas propriedades de suculência e maciez, bem como, segundo Lund, Hviid e Skibsted (2007) a oxidação da miosina, que pode ocasionar também na perda desses atributos. Tal solubilidade é influenciada pelos fatores pH, temperatura e início do *rigor mortis*, ou seja, rigidez após a morte (ROÇA, 2012).

O parâmetro pH exerce forte influência na qualidade da carne. O músculo correspondente ao de um animal vivo possui pH de valor 7,2 (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007), enquanto a faixa de pH normal para a carne de frango ideal para o consumo, de um animal previamente abatido, corresponde ao valor de 5,7 a 6,1 (BEAUCLERCQ et al., 2016). Observa-se que alterações significativas de pH ocorrem de um animal que passa da condição *ante mortem* (antes da morte) para *post-mortem* (após a morte), ou seja, na transformação de músculo em carne, fato este relacionado com o processo de contração muscular.

O processo de contração muscular em um animal vivo ocorre com gasto de energia, no caso, adenosina trifosfato (ATP), segundo uma condição aeróbica. Quando um animal é abatido, não chega mais oxigênio nos seus músculos, no entanto, as reações bioquímicas continuam ainda por um tempo, de maneira que, para efetuá-las, o organismo requisita a via anaeróbica, utilizando sua reserva energética na forma de glicogênio. Uma vez que o glicogênio é consumido para gerar ATP, por meio da glicólise anaeróbica, ocorre a formação de ácido lático. Este é o responsável por acidificar o músculo, alterando seus valores de pH levando o mesmo a, de fato, ser carne (BEAUCLERCQ et al., 2016). Abaixo do valor mínimo de pH de 5,7, tem-se uma carne considerada ácida e classificada como PSE (do inglês: *pale, soft and exudative*), que significa uma carne de características pálida, mole e exsudativa. Já acima do limiar de pH 6,1, tem-se um produto classificado como DFD (do inglês: *dark, firm and dry*), que se traduz em uma carne de características superficiais escura, firme e seca (PEARSON; DUTSON, 1994; BARBUT, S., 1997; BEAUCLERCQ et al., 2016).

A carne PSE corresponde a uma condição indesejável, reflexo de estresse *ante mortem* ao qual o animal pode ser submetido, causando acidez do músculo e desnaturação das proteínas (PRAXEDES, 2007; TAKAHASHI, 2007). Já a carne DFD trata-se de uma condição anormal associada também ao estresse *ante mortem*, quando o pH muscular *post mortem* se mantém alto, nas proximidades do valor

fisiológico (SCHNEIDER, 2004), comprometendo propriedades funcionais. Portanto, as propriedades de cor e pH também se relacionam de maneira inversamente proporcional (FLETCHER; QIAO; SMITH, 2000; QIAO et al., 2000; WOELFEL et al., 2001).

Desta forma, pode-se afirmar que todos os parâmetros diretos e indiretos que contribuem para condições anômalas, tais como os fenômenos PSE e DFD, são negativos e de grande interesse para a indústria, uma vez que exercem influência econômica quanto ao desempenho/qualidade do produto final que vai para a mesa do consumidor.

1.4 Problemas de Saúde Pública Associados ao Alto Consumo de Carne

Concomitante ao aumento no consumo mundial de carne, surge um problema de saúde pública. Acredita-se que o pigmento ferro-heme (mioglobina) presente na carne esteja diretamente relacionado ao processo de tumorigênese. O teor de ferro-heme em carne vermelha é 10 vezes mais elevado quando comparado à carne branca (ISHIKAWA et al., 2010). Estudos de meta-análise demonstraram que um alto consumo de carne vermelha e carne curada adicionada de nitrito de sódio aumentam o risco de desenvolver câncer colorretal em 20 a 30% (CORPET, 2011). Desta forma, ainda que em menor escala, a carne de frango também é propensa ao desenvolvimento de enfermidades para os que dela se alimentam.

O íon de ferro é um forte agente pró-oxidante e durante o processo de digestão da mioglobina, o pigmento ferro porfirina, pode ser ativado a espécies hipervalentes de ferro, desenvolvendo assim o papel de um eficiente gerador de radicais. As espécies de ferro-heme podem participar na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), - do inglês *reactive oxygen species* e *reactive nitrogen species*, respectivamente - e, as reações intracelulares envolvendo ROS e RNS podem resultar na iniciação e progressão da carcinogênese por indução de mutações genéticas, danos cromossômicos e outros efeitos citotóxicos. Uma vez que as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são capazes de regular a expressão de genes ativos durante a diferenciação e proliferação celular, provavelmente possam desempenhar um importante papel na fase de promoção da geração do tumor (PAN; LAI; HO, 2010), conforme exemplificado na figura 2.

Figura 2 - Tumorigênese e o papel da inflamação no desenvolvimento do câncer. ROS = espécies reativas de oxigênio; RNS = espécies reativas de nitrogênio; NO = óxido nítrico; PGs = prostaglandinas; ODC = ornitina descarboxilase; MMP = matriz metaloproteinase; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular.

Fonte: Adaptação de Ceribeli (2016) a partir de PAN, M. H.; LAI, C. S.; HO, C. T. 2010, p. 22. Publicação de conteúdo licenciado: Food & Function; Editor de conteúdo licenciado: Royal Society of Chemistry; Número da licença: 3994300150533.

Em alimentos e sistemas biológicos, os antioxidantes apresentam um papel importante na desativação de radicais, de ROS, de RNS e de espécies de ferro-heme hipervalentes. Para alimentos, este fato fica mais evidente na atualidade, já que, aparentemente, os antioxidantes que protegem lipídeos não necessariamente protegem proteínas, pelo menos em produtos cárneos (LUND; HVIID; SKIBSTED, 2007).

1.5 Espécies Reativas

As espécies reativas mais abundantes em meio biológico são as ROS e as RNS. Estas espécies foram assim intituladas entre 1970 e 1990, devido à maioria dos radicais e oxidantes terem dependência com o oxigênio molecular e com o nitrogênio (AUGUSTO, 2006; LIBARDI, 2014).

O aumento da produção celular das chamadas ROS e RNS, devido a fatores tais como: radiação de alta energia, alta tensão de oxigênio, metabolismo de poluentes e medicamentos, combate a microorganismos ou disponibilidade de íons de metais de transição, promove a oxidação de lipídeos, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA). Tais condições culminam no organismo com uma situação de estresse, que consiste numa interferência da homeostase. A homeostase (*homeo* = igual; *stasis* = ficar parado) é o termo que trata da estabilidade de um organismo,

significando uma condição de normalidade em que o meio interno do corpo permanece dentro de certos limites fisiológicos, com concentração adequada de substâncias químicas, e parâmetros relativamente constantes de temperatura e pressão. Quando do desequilíbrio da homeostase, a quantidade de espécies oxidantes predomina frente às espécies antioxidantes, acarretando um potencial dano ao organismo (AUGUSTO, 2006).

As consequências do desequilíbrio da homeostase podem influenciar desde aspectos de cunho econômico, como no caso da carne para o consumo, o efeito da aceleração do processo deteriorativo e perda de qualidade do produto que afetam o seu tempo de prateleira, como em aspectos da saúde pública, conforme já mencionado, uma vez que o fenômeno pode acarretar no desenvolvimento de doenças degenerativas, tal como o câncer (LIBARDI, 2014). A figura 3 mostra as principais fontes de espécies reativas e seus papéis no organismo.

Figura 3 – Principais fontes de oxidantes e radicais e seus papéis patofisiológicos.

Fonte: Adaptação de Ceribeli (2016) a partir de AUGUSTO, O., 2006, p. 86. Com permissão de Oficina de Textos.

As espécies reativas podem ser ou não radicalares.

Radical (radical livre) é uma entidade molecular tal como $\cdot\text{CH}_3$, $\cdot\text{SnH}_3$, $\text{Cl}\cdot$ possuindo um elétron desemparelhado. (Para estas fórmulas o ponto, simbolizando o elétron desemparelhado, deve ser colocado de forma a indicar o átomo de maior densidade de spin, se isto é possível). Íons de metais paramagnéticos normalmente não são considerados radicais. No entanto, na “analogia isolobal” a similaridade entre íons de metais paramagnéticos e radicais torna-se aparente. Pelo menos no contexto da química orgânica física, parece desejável deixar de usar o adjetivo “livre” no nome geral deste tipo de espécies químicas e entidades moleculares, de modo que o termo “radical livre” pode, no futuro, ser restrito àqueles radicais que não formam partes de pares de radicais. Dependendo do átomo central que possui o elétron desemparelhado, os radicais podem ser descritos como carbono-radicaís, oxigênio-radicaís, nitrogênio-radicaís e radicais centrados no metal. Se o elétron desemparelhado ocupa um orbital tendo considerável caráter s ou mais ou menos caráter p puro, os respectivos radicais são denominados σ - ou π -radicaís. No passado o termo “radical” foi usado para designar um grupo substituinte ligado a uma entidade molecular, em vez de “radical livre”, que hoje em dia é simplesmente chamado de radical. As entidades ligadas podem ser chamadas grupos ou substituintes, mas não devem mais ser chamadas de radicais (IUPAC GOLD BOOK, 2014).

Na figura 4 é possível observar o exemplo do átomo de oxigênio que possui 2 elétrons desemparelhados e da molécula de O_2 , que possui também 2 elétrons desemparelhados.

Figura 4 – Distribuição eletrônica dos elétrons para os átomos de oxigênio em orbitais atômicos e para a molécula de O_2 em orbitais moleculares.

Fonte: Autoria própria.

As principais espécies reativas conhecidas inclusive as existentes em meio biológico, são descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Algumas das Principais Espécies Reativas, oxidantes e pró-oxidantes, em meio biológico.

Espécie	Nome
$^3\text{O}_2$	Oxigênio
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Ânion Radical Superoxido
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
$\text{HO}^{\cdot}$	Radical Hidroxila
$\text{LOO}^{\cdot}$	Radical Peroxila derivado de lipídeo
$\text{LO}^{\cdot}$	Radical Alcoxila derivado de lipídeo
$\text{R}^{\cdot}$	Radical Alquila
$\text{ROO}^{\cdot}$	Radical Peroxila
$\text{RO}^{\cdot}$	Radical Alcoxila
$\text{Ar}^{+\cdot}$	Cátion Radical
$\text{Ar}^{\cdot-}$	Ânion Radical
$^1\text{O}_2^*$	Oxigênio Singlete ($^1\Delta_g\text{O}_2$)
HClO	Ácido Hipocloroso
$\text{CO}_3^{\cdot-}$	Ânion Radical Carbonato
$\text{NO}_2^{\cdot}$	Radical Dióxido de Nitrogênio
$\text{ONOO}^{\cdot-}$	Ânion Peroxinitrito
$\text{NO}^{\cdot}$	Radical Óxido Nítrico
$\text{CO}_2^{\cdot-}$	Ânion Radical Dióxido de Carbono
NO	Óxido Nítrico
$\text{RS}^{\cdot}$	Radical Tiil (cisteína)
$\text{RSSR}^{\cdot-}$	Ânion Radical Dissulfeto
$\text{GS}^{\cdot}$	Radical Glutationa
Fe^{3+}	Cátion Ferro (III)

Fonte: Autoria própria.

Os radicais podem ser produzidos através da quebra de ligações covalentes, fenômeno designado por homólise, devido ao fornecimento de energia na forma de luz fenômeno denominado por fotólise, por ação do calor (termólise) ou em consequência de radiação de alta energia (radiólise). Reações de transferência de elétrons (reações redox) como exemplificado para a reação de Fenton, que é recorrente em meio biológico, também produzem radicais (AUGUSTO, 2006). A figura 5 ilustra essas reações.

Figura 5 – Processos envolvidos na produção de radicais.

Fonte: Adaptação de Ceribeli (2016) a partir de AUGUSTO, O., 2006, p. 27. Com permissão de Oficina de Textos.

Uma técnica empregada no estudo de radicais é a Ressonância Paramagnética de Elétrons (RPE) do inglês *Electron Paramagnetic Resonance* (EPR).

Os radicais em sua maioria, são espécies instáveis, com tempos de meia vida curtos, da ordem de microssegundos (μs). Isto torna seu estudo mais complicado, de forma que não é possível efetuar a técnica de RPE de forma direta. Neste sentido, tornam-se necessárias algumas adaptações como: o rápido congelamento (*rapid freezing*), para que se aumente o tempo de vida da espécie, o RPE em fluxo contínuo, em que se diminui o tempo entre a formação e a observação da espécie, ou o uso de uma armadilha de spin (*spin trapping*), transformando a espécie de interesse num radical, porém estável. Esta última, existente a aproximadamente 4 décadas (MACKOR; WAJER; DEBOER, 1966 apud KEPLER 2009), normalmente tida por método indireto, consiste na reação de um radical transitório com um captador de spin, resultando em um aduto radical mais estável e fácil de ser detectado (JANZEN, 1971).

Comumente, utilizam-se nitronas (N-óxidos) como captadores, pois estas podem reagir com diversos tipos de radicais (centrados em Carbono e Oxigênio), onde o aduto radical formado (pertencente à classe aminoxila), é o que possui maior persistência em solução, dentre os conhecidos (KEPPLER, 2009). Compostos nitrosos também são capazes de produzir radicais aminoxila, sendo também bastante empregados.

As nitronas mais importantes utilizadas como *spin trapping* consistem na N-tert-butil- α -fenilnitrona (PBN), N-tert-butil- α -4-piridil-1-óxido nitrona (4-POBN), 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO) e 5-(dietoxifosforil)-5-metil-1-pirrolina-N-óxido DEPMPO. Já dos compostos nitrosos, utilizam-se geralmente 2-metil-2-nitrosopropano (MNP), Nitrosobenzeno (NB) e 3,5-dibromo-4-nitrosobenzeno sulfonato (DBNBS). A figura 6 exemplifica as estruturas químicas de alguns dos *spins trappings* citados.

Figura 6 - Estruturas químicas das moléculas de (a) PBN, (b) 4-POBN e (c) MNP que atuam como armadilhas químicas.

Fonte: Autoria própria.

A seguir (figura 7) tem-se as reações genéricas de uma nitrona com um radical (reação a), e de um composto nitroso com um radical (reação c) formando ambos, espécies aduto radical. No segundo caso, são produzidos radicais aminoxilas e a estabilidade destes é assegurada pela deslocalização do elétron desemparelhado entre os átomos de oxigênio e nitrogênio (KEPPLER, 2009). Demonstra-se também duas reações exemplos referentes as armadilhas químicas PBN (reação b) e MNP (reação d) com espécies radicalares.

Figura 7 – Reações entre armadilhas químicas e radicais; (a) Reação genérica entre uma nitrona e um radical; (b) Reação exemplo entre a nitrona PBN e um radical; (c) Reação genérica entre um composto nitroso e um radical; (d) Reação exemplo entre o composto nitroso MNP e um radical.

Fonte: Autoria própria.

1.6 Os antioxidantes

Os diversos processos redox que ocorrem nos músculos dos animais são os principais fatores não-biológicos responsáveis pela deterioração da qualidade da carne. As reações oxidativas envolvendo proteínas e lipídeos, juntamente com o crescimento microbiano, são as causas mais frequentes da degradação da carne. Estudos recentes comprovaram que a oxidação de proteínas durante a etapa de armazenamento é um problema sensorial com respeito à maciez e suculência da carne (LUND et al., 2011). Neste sentido, o uso de antioxidantes adicionados à dieta animal tem sido cada vez maior.

Antioxidantes são substâncias químicas de origem natural ou sintética que, presentes em concentrações pequenas comparadas à substância oxidável, inibem ou retardam a oxidação de um substrato ou estruturas sensíveis, promovendo o reparo destas, agindo inclusive como sinalizadores celular e induzindo a expressão de antioxidantes endógenos (SIES, 1997).

Um produto que tem ganhado bastante destaque neste sentido trata-se da erva-mate, de nome científico *Ilex paraguariensis*.

1.7 *Ilex paraguariensis* (erva-mate)

A erva-mate é uma árvore da família das aquifoliáceas, originária da região subtropical da América do Sul, presente na região sul, centro-oeste e sudeste do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Uruguai (FILIP; FERRARO, 2003). Cerca de 80% da área de ocorrência pertence ao Brasil, sendo distribuída entre os estados de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. O processamento e comercialização da erva-mate é realizado principalmente por pequenos produtores que se reúnem em cooperativas, sendo que a região sul se destaca como a maior produtora (HECK; DE MEJIA, 2007).

Num comparativo nacional, o estado do Paraná lidera a produção de erva-mate, com 86,3% da quantidade, representando, no ano de 2014, 333.017 toneladas. Neste mesmo ano, este produto se destacou pelo valor da produção num montante de R\$ 403,1 milhões, atrás apenas do açaí, com um valor de R\$ 422,0 milhões. Pesquisas deste período mostram ainda que em valores absolutos, a erva-mate é o produto que apresentou maior oscilação positiva, pelo segundo ano consecutivo dentre os produtos de extrativismo vegetal (INSTITUTO BRASILEIRO DE

GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2014). Isto mostra a importância deste produto, que movimenta a economia e é fonte de renda para diversos grupos.

No contexto internacional, o Brasil lidera a sua produção. Os principais clientes da erva-mate brasileira são os países do Mercosul, sendo o Uruguai o maior deles, recebendo cerca de 85% das exportações, seguido pelo Chile, que recebe 11% das exportações, além de Alemanha, Estados Unidos, Japão, Canadá, Síria, dentre outros (JUSBASIL, 2007).

O consumo de erva-mate se dá principalmente pelo uso de suas folhas. Estas são consumidas em infusões, em bebidas como chás. Tal hábito, advém do grupo étnico Guarani (BRACESCO et al., 2011) e, atualmente no Brasil, o consumo está associado principalmente aos estados do sul do país, nos quais a bebida recebe nomes característicos como chimarrão ou tererê. Seus frutos são consumidos por aves. Na figura 8 é possível observar o perfil desta planta, desde sua árvore até suas folhas e frutos.

Figura 8 – Árvore (a), folhas (b) e frutos (c) referentes a Erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

Fonte: Autoria própria. Elementos e imagens de domínio público.

A erva-mate é constituída por diversos fitoquímicos, sendo que os mais importantes são os compostos fenólicos, as saponinas e as metilxantinas. As metilxantinas (figura 9) são substâncias de ação reconhecida sobre o sistema nervoso central, sendo lhes atribuída a ação estimulante da erva-mate. As principais metilxantinas encontradas na erva-mate são: cafeína, teobromina e teofilina (ALIKARIDIS, 1987).

Figura 9 - Estruturas químicas das moléculas de algumas metilxantinas; (a) cafeína, (b) teobromina e (c) teofilina.

Fonte: Autoria própria.

As saponinas (figura 10) são as responsáveis pelo sabor amargo e formação de espuma na bebida. Além de outras atividades biológicas, a atividade anti-inflamatória da erva-mate é atribuída a estas substâncias. Dentre as saponinas presentes na erva-mate, as que mais se destacam são as saponinas triterpenóides (em torno de 10% m/m), tendo como principal aglicona o ácido ursólico e seu isômero ácido oleanólico (GNOATTO et al., 2008).

Figura 10 - Estruturas químicas das moléculas de algumas saponinas; (a) ácido ursólico e (b) ácido oleanólico.

Fonte: Autoria própria.

Os compostos fenólicos (figura 11) são conhecidos por sua ação adstringente e, principalmente, por sua ação antioxidante. Entre os compostos fenólicos presentes na erva-mate, destaca-se o elevado conteúdo de derivados cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico e seus isômeros (CARDOZO JUNIOR et al., 2007). Além do ácido clorogênico, os flavonóides rutina, quercetina, diglicosídeo de luteolina, taninos e

cafeoilglicose também estão presentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (FILIP et al., 2001).

Figura 11 - Estruturas químicas das moléculas de alguns compostos fenólicos; (a) ácido clorogênico; (b) rutina e (c) luteolina.

Fonte: Autoria própria.

O uso da erva-mate como alimento funcional é relativamente recente, sendo que os primeiros trabalhos realizados com os seus extratos foram publicados na década de 90. Nesses trabalhos foi demonstrada a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de infusões de erva-mate verde e seca (GUGLIUCCI; STAHL, 1995; GUGLIUCCI, 1996; CAMPOS; ESCOBAR; LISSI, 1996).

A ação da erva-mate já foi descrita em vários trabalhos. Alguns deles, por exemplo, ressaltam o potencial desta como um extrato antioxidante em alimentos como vinhos (CAMPOS; ESCOBAR; LISSI, 1996). Outras pesquisas também relatam a ação antioxidante da erva-mate, porém em relação ao próprio corpo humano (GUGLIUCCI; STAHL, 1995; GUGLIUCCI, 1996). Já no que tange aos interesses desta pesquisa, estudos mostraram que o extrato das folhas da erva-mate melhorou a estabilidade oxidativa de lipídeos da carne de aves de frango de corte, que foram alimentados com rações acrescentadas de extratos aquosos preparados com esta erva (RACANICCI et al., 2011). O mecanismo de proteção envolvido na suplementação da alimentação animal com mate, no entanto, ainda é desconhecido.

1.8 Ciências ômicas: Metabolômica e Foodômica

Nos últimos anos, as pesquisas nas áreas de ciência dos alimentos e nutrição têm ganhado bastante destaque, uma vez que, há uma grande preocupação com a

qualidade do que se ingere e o potencial risco de doenças associadas. Isto se tornou possível, devido ao desenvolvimento durante décadas, de estudos via métodos analíticos. Estes métodos relacionam-se com uma abordagem de alto rendimento, onde uma remessa volumosa de medições pode ser efetuada em um curto período de tempo, denominada “*Omics*” (do inglês), em português “Ômicas ou Ome” (CAPOZZI; BORDONI, 2013).

Ome é um sufixo cujo significado se trata do conjunto homogêneo de itens como um todo. Há 4 tipos principais de análises ômicas de alto desempenho: genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, sendo que, a partir destas, outras surgiram, com suas particularidades, técnicas e ferramentas interpretativas, como epigenômica, lipidômica, interactômica, (CAPOZZI; BORDONI, 2013), foodômica, etc.

Dois temas que sobressaem dentro do contexto apresentado, tratam-se da metabolômica e da foodômica.

A metabolômica se baseia no uso de técnicas analíticas capazes de identificar e quantificar metabólitos de baixa massa molecular (menor que 1500 daltons) que são sintetizados ou modificados por uma célula viva ou um organismo, o metaboloma (FIEHN et al., 2000). Durante o metabolismo, os metabólitos são transformados quimicamente, proporcionando um funcionamento regular do estado celular (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012; ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015), se caracterizando como evidências da ocorrência de atividade bioquímica (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012) e impressões digitais oriundas dos processos celulares específicos (HONG, 2011). Devido a isso, a metabolômica tem se tornado importante nos últimos anos, uma vez que, aliada a novas ferramentas de análises, permite que se faça uma correlação entre alterações bioquímicas e fenotípicas (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012).

Os trabalhos apresentados na literatura nesta área, têm como meta a obtenção de uma visão metabólica global do sistema através da aquisição de um padrão de metabólitos (“*metabolic fingerprinting*”), por meio de métodos analíticos de triagem de alto desempenho e busca de fatores discriminantes utilizando métodos quimiométricos (SCHRIPSEMA, 2010).

A análise metabolômica tem sido utilizada em diversas áreas da ciência, pois é capaz de indicar o ponto final de um evento biológico, tal como uma alteração genética (efeito endógeno) ou uma interação influenciada pelo ambiente (efeito

exógeno). Sendo assim, a metabolômica vem sendo empregada no estudo da toxicidade de fármacos (LENZ et al., 2004; STOUGHTON; FRIEND, 2005), infecções parasíticas (LI et al., 2008; SARIC et al., 2008), na elucidação dos mecanismos de desenvolvimento de doenças (KIND et al., 2007; YANG et al., 2007) e, também, o efeito da ingestão de alimentos no perfil metabólico, o que levou ao surgimento de uma nova ciência “ômica” denominada foodômica, do inglês *foodomics* (HERRERO et al., 2010).

A foodômica surgiu da necessidade de uma nova vertente que abrangesse três das principais análises ômicas, a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica, uma vez que todas sofrem influência das relações existentes entre o organismo e estímulos externos, sendo um destes fatores, a dieta. (CAPOZZI; BORDONI, 2013). Trata-se de uma ciência que integra os componentes alimentares, os alimentos, a dieta, o indivíduo, a saúde e as doenças. Segundo Herrero et al. (2012) e Cifuentes (2012), é definida como uma disciplina global que abrange diversas áreas que trabalham com alimentos como objeto principal de estudo, tecnologias analíticas avançadas - o que leva à atribuição do sufixo *omics* à palavra - e a combinação de elementos de bioinformática. Também faz parte de seu escopo, a abordagem abrangente e de alto rendimento para a exploração da ciência dos alimentos em detrimento de uma melhora na nutrição humana. (CIFUENTES, 2012).

Tal área recebeu maior atenção após a primeira conferência internacional realizada em Cesena, na Itália, no ano de 2009, cujo evento repete-se a cada dois anos (CAPOZZI, BORDONI, 2013). A Figura 12 demonstra onde a foodômica se insere em relação às outras áreas de análises ômicas.

Figura 12 – Relação entre as áreas proteômica, transcriptômica, metabolômica e foodômica.

Fonte: Autoria própria. Elementos e imagens de domínio público.

1.9 Metabolômica Alvo e Metabolômica sem Alvo

Os estudos em Metabolômica e Foodômica podem se subdividir em dois tipos: Análises sem alvos (do inglês *Untargeted analysis*) e Análises com alvos (do inglês *Targeted analysis*).

Estudos *Untargeted Analysis*, como a tradução do próprio nome sugere, tratam-se da análise de metabólitos não específicos. Essa abordagem dispensa a necessidade de uma hipótese pré-existente específica sobre determinado conjunto de metabólitos, se atendo à observação do perfil total destes. São análises caracterizadas por medidas simultâneas de um grande número de metabólitos de cada amostra. Devido à grande quantidade e complexidade dos dados gerados, são requisitadas em suas análises, eficientes ferramentas de bioinformática. (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015; ROBERTS et al., 2012)

A *Targeted analysis* ou análise de metabólitos específicos, consiste em estudos de análises de um conjunto de metabólitos pré-definidos, feitos com altos

rigores de precisão e exatidão (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015), o que faz com que esse método seja preferido quando a intenção da análise está na quantificação das espécies obtidas.

Em análises nestes contextos, duas importantes técnicas comumente são aplicadas, sendo elas a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do inglês *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) e a Espectrometria de Massas (MS) do inglês *Mass Spectrometry* (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015; FUHRER; ZAMBONI, 2015). Ambas as técnicas apresentam ônus e bônus, uma vez que no caso da Espectrometria de Massas, pode-se destacar uma maior sensibilidade deste método frente a uma visão mais fragmentada dos metabólitos. Em contrapartida, a RMN é mais simples e rápida em termos de obtenção de dados e proporciona uma visão geral do metaboloma mesmo em misturas complexas, sem que seja necessário o tratamento prévio da amostra. De qualquer maneira, a melhor aplicação nestas áreas, sugere o uso simultâneo de referidas técnicas, uma vez que as mesmas podem ser complementares. (PICONE et al., 2011a; KRISHNAN; KRUGER; RATCLIFFE, 2005; COLQUHOUN, 2007).

Rezzi et al. (2007), faz menção a tais técnicas na literatura, em estudos destinados a melhorar a saúde dos indivíduos através da dieta. Ademais, a aplicação de RMN relacionada com a metabolômica é recente na literatura e representa a oportunidade de descrever a heterogeneidade entre fontes alimentares diferentes, observando-se todo o padrão metabólico, em vez de se ater a alguns metabólitos específicos (SAVORANI et al., 2010; PICONE et al., 2011b).

1.10 Ressonância Magnética Nuclear

O surgimento da técnica de RMN remonta desde o início da década de 20, com alguns relatos sobre experimentos que faziam alusão ao fenômeno. Em 1939 ocorreu a primeira observação de RMN, quando Rabi e seus colaboradores submeteram um feixe de moléculas de hidrogênio a um campo magnético não homogêneo e, em seguida, a um campo homogêneo, com aplicação de radiofrequências, verificando que, para certo valor definido de frequência, o feixe molecular absorvia energia e sofria um pequeno desvio. No entanto, pode-se dizer que a técnica ganhou de fato visibilidade por volta de 1945, quando Bloch, Purcell e colaboradores efetuaram os experimentos com uso de amostras líquidas e sólidas,

levando ambos pesquisadores ao recebimento do Prêmio Nobel em 1952 (GIL; GERALDES, 1987). A partir de então, a técnica de RMN passou a ser vista promissora no campo da pesquisa até surgirem os equipamentos comercializados e modernizações cada vez maiores, como, por exemplo, o uso da técnica de pulsos, mais difundida e utilizada atualmente, em detrimento da radiação contínua.

A RMN é uma técnica bastante versátil e importante ferramenta da atualidade, aplicável a diferentes contextos de análises químicas. Útil desde a elucidação estrutural de substâncias, incluindo macromoléculas no ramo da bioquímica, polímeros e biopolímeros, à cinética de reações, análise qualitativa e quantitativa de produtos farmacêuticos, engenharia de materiais, diagnósticos em medicina, alimentos e outras (MORAES; COLNAGO, 2014; GIL; GERALDES, 1987).

Estudos relativos à qualidade de alimentos e análises destes envolvendo técnicas de alta performance como a RMN, mostram-se como um campo promissor, com várias pesquisas propostas na área, envolvendo não apenas produtos cárneos como outros alimentos. Forato et al. (2009) descreve o perfil de ácidos graxos em gordura de bovinos envolvendo análises por RMN. Maria (2010) em trabalho com carne bovina propõe um método para determinação de ácido linoleico conjugado (CLA), assim como, Prema et al. (2013) propõe um método de determinação e quantificação de CLA em queijos de origem canadense, ambos por meio do uso de RMN.

O princípio da técnica de RMN se baseia na propriedade do núcleo atômico que, tal qual o elétron, além de carga (q), massa (m) e magnetismo (μ), é dotado também de spin (I), definido como o movimento de rotação de uma partícula em torno de um de seus eixos (GIL; GERALDES, 1987). Devido a ele, os núcleos encontram-se em movimento de rotação, similar a pequenos ímãs, distribuídos aleatoriamente, com movimentos rotacionais, que, no entanto, não seguem uma orientação ordenada de seus eixos. O fenômeno de ressonância magnética nuclear ocorre quando esses núcleos são submetidos a um campo magnético externo constante (B_0), que os faz mudar a orientação de seu spin (I) e suas respectivas magnetizações (μ) em relação a tal campo somente de duas maneiras: a favor ou contra o mesmo formando dois níveis energéticos distintos (α e β) a serem ocupados (AUGUSTO, 2006), o que se denomina por Efeito Zeeman. Em seguida, aplicando-se um campo magnético oscilante de radiofrequência (B_1), caso esta radiação possua frequência igual à

frequência de oscilação dos spins nucleares, estes entrarão em ressonância e, conseqüentemente, serão induzidos a absorver ou emitir energia segundo a condição de Bohr (equação 1),

$$\Delta E = h \cdot \nu, (1)$$

onde ΔE trata-se da variação de energia, h refere-se à constante de Planck e ν é a frequência de ressonância.

Neste momento é que ocorre o registro do sinal de RMN, quando da emissão ou absorção de energia devido ao transitar dos spins entre os diferentes níveis energéticos e regresso da magnetização ao seu estado original, fenômeno descrito pela distribuição de Boltzman

$$\Delta E = E_{\alpha} - E_{\beta} = \gamma \cdot \frac{h}{2} \cdot B, (2)$$

em que γ representa a razão magnetogírica constante para cada isótopo e B o campo magnético.

Este fenômeno se traduz no sinal que é observado, o FID (do inglês *Free Induction Decay* que significa decaimento livre de indução), e que a princípio, é expresso no domínio do tempo. Após a Transformada de Fourier, do inglês Fourier Transform (FT), o tratamento matemático que automaticamente é efetuado pelo próprio equipamento, é possível a obtenção do gráfico de interesse, com os sinais em função da frequência (f) com unidade em Hz, ou mais comum, em função do deslocamento químico (δ) com unidade em ppm que representa a frequência como fração da frequência de ressonância absoluta, em ambos os casos denominado como espectro (COLNAGO, 2015¹; MORAES, 2011²).

Cada núcleo (no caso de Hidrogênio), apesar de se tratar do mesmo elemento químico, possui frequência de ressonância diferente, decorrente do ambiente eletrônico (influência sofrida por referido núcleo em relação aos demais átomos que, via ligação química e conformação espacial interferem neste) a que está submetido, fato este que implica que, os ambientes magnéticos de cada núcleo sejam também distintos. As frequências de ressonância são medidas em relação a uma substância padrão, em geral o tetrametilsilano (TMS) estipulado como valor zero ppm. Na RMN unidimensional, o sinal é apresentado como uma função de um único parâmetro, em

¹ COLNAGO, L. A. Curso de RMN – slides de aulas. Mensagem recebida por Luiz Alberto Colnago (luiz.colnago@embrapa.br). Em 18 dez. 2015.

² MORAES, T. B. Equações de Bloch e Transformada de Fourier – slides de aulas. Mensagem recebida por Tiago Bueno Moraes. Em 17 set. 2015.

geral o deslocamento químico. Pode-se dizer que na RMN, três aspectos se destacam como importantes para os resultados obtidos: a posição do sinal no espectro conforme já citado; a intensidade com a qual o sinal se expressa, pois mantém relação direta com a quantidade de núcleos que experimentam aquela mesma frequência de ressonância; e a forma dos sinais, uma vez que a interferência do ambiente magnético ocupado pelo núcleo faz com que haja desdobramentos e alterações dos mesmos, segundo a condição dada pela equação 3,

$$M = 2.n.I + 1, (3)$$

onde M corresponde à multiplicidade do sinal, n corresponde à quantidade de núcleos vizinhos e I corresponde ao valor do spin do núcleo que está sendo analisado. Os desdobramentos formam as chamadas estruturas hiperfinas, com constante de acoplamento designada por J, mensurada em Hz e calculada para um sistema de primeira ordem de acordo com a equação 4

$$J_{ab} = f_{a_1} - f_{a_2}, (4)$$

em que J_{ab} significa o acoplamento entre os núcleos a e b e a influência disto sobre o desdobramento do sinal referente ao núcleo a; f_{a_1} representa a frequência de um dado pico para o sinal em análise e a frequência f_{a_2} representa a frequência do pico subsequente ao primeiro ou outro de interesse, dentro do mesmo sinal. Os valores de J_{ab} e J_{ba} devem ser os mesmos (o que condiz com o fato dos núcleos estarem acoplando). No caso do espectro em unidade ppm, deve-se multiplicar o resultado da diferença pelo valor de magnitude do campo magnético do equipamento representado em MHz referente ao núcleo que está sendo analisado. A figura 13 ilustra um resumo sobre em que consiste o fenômeno de RMN.

Desta forma, esta técnica permite efetuar um mapeamento das amostras cárneas em relação à composição de metabólitos que, por sua vez, interferem na dinâmica do processo de estabilidade oxidativa e qualidade da carne (WOOD et al., 2008).

Figura 13 – Representação simplificada do fenômeno de RMN; B_0 e B_1 são o campo magnético constante e oscilante, respectivamente; μ a magnetização referente a cada núcleo; μ_{Total} referente à soma vetorial das magnetizações; J_{ab} e J_{ba} referem-se as constantes de acoplamento hiperfino e as letras a e b destacam os núcleos de H submetidos a diferentes ambiente eletrônico e magnéticos.

Fonte: Autoria própria.

1.11 Ressonância Paramagnética de Elétrons e o estudo de estabilidade oxidativa

Uma vez que o processo de oxidação acarreta na formação de radicais (espécies que possuem elétrons desemparelhados), estes podem ser detectados por meio da RPE, conforme já citado. Tal técnica foi descoberta por Zavoiski, em 1945 (RAMONI, 2000).

As técnicas espectroscópicas de ressonância magnética tal qual a nuclear e a eletrônica, baseiam-se ambas no fenômeno da interação da matéria com a radiação eletromagnética, de forma que ocorre efeito Zeeman, absorção ou emissão de energia e registro de um sinal associado de acordo com a condição de Bohr e a equação 1 (GIL; GERALDES, 1987). Pode-se dizer então, que esta técnica é análoga à RMN. No caso da RMN, trata-se da ressonância dos núcleos atômicos, enquanto na RPE, trata-se da ressonância dos elétrons (figura 14).

Figura 14 – Ilustração da visão do elétron e do núcleo através da técnica de RMN e RPE. Em (a) tem-se o referencial centrado no núcleo, em (b) tem-se o referencial centrado no elétron.

Fonte: Autoria própria.

A RMN também utiliza a técnica de pulsos, com radiações na faixa das ondas de rádio e campos magnéticos de altas intensidades, da ordem de 20 Tesla. Em contrapartida, a RPE em geral utiliza a aplicação de frequência contínua, com radiações na faixa das micro-ondas e campos oscilantes, de menor intensidade. Também a obtenção do sinal não é dada por FID, mas um sinal com intensidade que corresponde à derivada da intensidade do sinal realmente medido, com domínio dado

em função do campo magnético (unidade em Gauss). O valor de g , formato do sinal e estrutura hiperfina também são os principais parâmetros de análise. O fator g refere-se à nuvem eletrônica dos elétrons desemparelhados e mede a razão giromagnética do elétron (adimensional), sendo seu valor correspondente à coordenada x (campo magnético) exatamente no meio do espectro. O formato do sinal refere-se à interação do spin eletrônico com o campo magnético devido ao spin do próprio núcleo do átomo envolvido e à interação do spin do elétron com o campo magnético devido ao spin do núcleo dos seus vizinhos (KEPPLER, 2009). O cálculo referente a estes desdobramentos dentro do contexto deste trabalho ocorre da forma descrita pela equação de número 5

$$M = 2.I + 1, \quad (5)$$

onde I corresponde ao spin do núcleo referente ao qual o elétron está centrado e também corresponde ao spin do núcleo do átomo vizinho ao núcleo a que o elétron está centrado. Por fim, o cálculo da interação ou acoplamento hiperfino é dado pela diferença da distância entre picos, com unidade em Gauss, de acordo com a equação 6

$$A = B_1 - B_2 \quad (6).$$

No caso da interação entre o spin de um elétron com o spin de seu próprio núcleo, ocorre a geração de sinais de forma que B_1 corresponde ao valor de campo magnético de um pico e B_2 ao valor de campo magnético de outro pico (referente ao segundo sinal), o que no contexto deste trabalho se denomina por A_N . No caso da interação entre o spin do elétron com o spin do núcleo de seu vizinho, ocorre a geração de sinais de forma que B_1 corresponde ao valor de campo magnético de um pico e B_2 ao valor de campo magnético do segundo pico (dentro do mesmo sinal), o que no contexto deste trabalho se denomina por A_H . Assim, o valor de A_N é maior que de A_H , uma vez que a interação entre o elétron de um dado núcleo com este próprio núcleo é mais forte do que a interação deste mesmo elétron com o núcleo de seu vizinho. Portanto, a interação hiperfina e o valor de g tendem a ser diferentes, de acordo com o núcleo no qual o elétron está centrado.

A figura 15 permite entender melhor em que consiste a técnica de RPE.

Figura 15 – Representação simplificada do fenômeno de RPE. B corresponde ao campo magnético aplicado; m trata-se do número quântico direcional que é determinado por $\pm I$; $h \cdot \nu$ corresponde à energia; A_N e A_H são referentes às interações hiperfinas do spin do elétron do Nitrogênio com o spin de seu núcleo e do spin do elétron do Nitrogênio com o spin do núcleo de seu vizinho; g caracteriza o fator giromagnético.

Fonte: Autoria própria.

Conforme já citado anteriormente, apesar do tempo de vida curta dos radicais, a partir do uso de *spin trapping* (armadilha química), no caso o PBN, que torna os radicais mais estáveis, estes podem ser monitorados e ter sua concentração relativa determinada em uma amostra, uma vez que tal medida tem relação com a intensidade do sinal gerado no espectro (LEAL et al., 2004).

Pesquisas demonstradas por Racanicci, Danielsen e Skibsted (2008) e Bolumar, Andersen e Orlie (2011), reportam experimentos efetuados com carnes de frango em que é possível efetuar o monitoramento de sua estabilidade oxidativa e qualidade, sendo uma das técnicas analíticas utilizadas, a de RPE.

Assim, a análise do perfil de metabólitos polares para as carnes de frango via RMN e dos processos oxidativos via RPE podem mostrar uma importante relação quanto à estabilidade e qualidade da carne, bem como sua relação com a dieta alimentar.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho consistiu no estudo do perfil de metabólitos polares da carne de peito de frango, proveniente de animais confinados suplementados com 0 mg de antioxidantes/ Kg de ração (controle negativo); 125 mg de vitamina E na forma de acetato de tocoferol/ Kg de ração (controle positivo); extratos hidro-alcoólicos de erva-mate nas proporções de 250 mg/ Kg de ração; 500 mg/ Kg de ração; 750 mg/ Kg de ração ou 1000 mg/ Kg de ração, empregando-se a técnica de RMN de ^1H e de *spin-trapping* RPE a fim de verificar seu impacto na estabilidade redox e qualidade da carne.

2.2 Objetivos específicos

- Aplicar método analítico via RMN de ^1H para identificar metabólitos polares em carne de peito frango;
- Avaliar a estabilidade redox das mesmas amostras supracitadas por *spin-trapping* RPE e correlacioná-la com possíveis alterações nos perfis de metabólitos;
- Efetuar análise multivariada dos dados.

2. 3 Procedimento Experimental

2.3.1. Extrato de Erva-Mate

O extrato hidro-alcoólico das folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) foram processados e fornecidos pelo Grupo Centroflora (Botucatu, SP – Brasil, Dr. Ricardo Luis Araujo Dias). O mesmo consistiu em partículas de 40 mesh, contendo valores máximos de 6% de água, 6% de matéria orgânica e 6% de cafeína, sem adição de excipientes.

Sua produção se deu a partir de folhas frescas de erva-mate as quais foram submetidas ao processo de extração utilizando água:etanol 75:25 v/v, à temperatura de 90° C. Após a extração, o extrato foi seco em torre de spray-dry.

A caracterização química em termos de compostos fenólicos foi efetuada via cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e uso de fonte eletrospray

operando no modo de detecção de íon negativo (UPLC-HRESI-MS). Foram caracterizados mais de 40 compostos fenólicos no extrato, onde os ácidos clorogênico e 1,5-dicafeoilquínico foram os compostos majoritários, representando 58,2% e 28,4% do total, respectivamente.³

2.3.2. Animais e dieta

Os animais utilizados foram provenientes da colaboração entre o Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP), sob responsabilidade do professor doutor Daniel Rodrigues Cardoso, a Universidade de Brasília (UnB), sob coordenação da professora doutora Aline Mondini Calil Racanicci e a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, campus Piracicaba (ESALQ-USP), sob supervisão do professor doutor José Fernando Machado Menten, como parte das atividades do Projeto Pão e Carne para o Futuro (do inglês Beam Project) processo FAPESP 2011/51555-7.

O projeto delineado consistiu de um total de 1440 pintos de corte fêmeas. Deste montante, as amostras cárneas referentes a apenas 18 deles foram utilizadas neste trabalho. Uma vez que os animais foram tratados com 6 dietas distintas, cada grupo foi composto por 3 animais, denominados aleatoriamente por A, B e C.

Os tratamentos, que tiveram início desde o primeiro dia de idade e findaram aos 38 dias, consistiram em dietas administradas *ad libitum* e água. As mesmas foram formuladas de acordo com as exigências nutricionais (ROSTAGNO et al. 2011) e consistiram basicamente em dietas compostas por milho, farelo de soja (45%), óleo de soja, fosfato bicálcico, calcário, sal, DL-metionina 99%, L-lisina 78%, ingrediente inerte, vitamina + suplemento mineral, cloreto de colina 60%, L-treonina 98,5%, anticoccidianos e vitamina E (acetato de tocoferol) ou extrato de erva-mate, estes dois últimos variando de acordo com os tratamentos⁴.

A alimentação se dividiu em 4 etapas, aplicáveis durante um determinado período de dias, sendo a primeira etapa referente à dieta pré-inicial (de 1 a 7 dias de idade), a segunda referente à dieta inicial (de 8 a 21 dias de idade), a terceira

³ ZAWADZKI, A. D.; ARRIVETTI, L. O. R.; VIDAL, M. P.; CATAI, J. R.; NASSU, R. T.; TULLIO, R. R.; BERNDT, A.; OLIVEIRA, C. R.; FERREIRA, A. G.; NEVES-JUNIOR, L. F.; COLNAGO, L. A.; SKIBSTED, L. H.; CARDOSO, D. R. Mate extract as feed additive for improvement of redox stability, health value, sensory quality, and consumer acceptance of beef. **Food Chemistry**, 2016. Mensagem recebida por: Daniel Rodrigues Cardoso (drcardoso@iqsc.usp.br). Em 18 jul. 2016.

⁴ RACANICCI, A. M. C. Animal Performance and Metabolism, Meat Quality, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Added to Broilers Diets - Workshop BEAM - Bread and Meat for the Future. Mensagem recebida por <caroline.ceribeli@usp.br> em 17 set. 2015.

denominada crescimento (de 22 a 33 dias de idade) e a última denominada por dieta de acabamento (34 a 38 dias de idade). As concentrações de todos os ingredientes que compunham a dieta foram mantidas iguais para todos os tipos de tratamentos, variando de acordo com a etapa de alimentação citada anteriormente. Já as concentrações referentes à vitamina E ou extrato de erva-mate, mantiveram-se constantes desde o início até o final de todas as etapas, variando apenas suas quantidades de acordo com o respectivo tratamento⁴.

Desta forma, os tratamentos podem ser discriminados por T1 - 0 mg de antioxidantes/ Kg de ração (controle negativo), T2 - 125 mg de vitamina E/ Kg de ração (controle positivo), T3 – 250 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração, T4 - 500 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração, T5 – 750 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração e T6 - 1000 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração. Ressalta-se que no caso do tratamento T2 com a vitamina E, utilizou-se o produto comercial Microvit E Promix 50 da empresa Adisseo, cuja composição é acetato de tocoferol diluído em sílica na proporção de 50%.

Dos cortes obtidos dos frangos, fez-se uso neste trabalho apenas do peito, sendo que, após o abate dos animais, os tecidos coletados foram transportados sob refrigeração (0°C), embalados a vácuo e armazenados em freezer biológico a -80°C até o momento da manipulação para os devidos experimentos. A figura 16 ilustra os diferentes tratamentos e a quantidade de animais distribuídos em cada um deles.

Figura 16 – Especificação dos tratamentos aos quais os frangos foram submetidos na dieta.

Fonte: Autoria própria.

2.3.3. Extração de Metabólitos Polares na Carne de Frango para Análise via RMN

Porções de aproximadamente 0,1 g de carne de peito de frango foram homogeneizadas em 1 mL de solução metanol : água 1 : 1 v/v (AppliChem Panreac; Milli-Q Millipore), usando o sistema de desrupção celular mecânica MP Biomedicals FastPrep®-24 (Solon, OH) a 4.5 m/s por 1 minuto, com esferas de cerâmica. Em seguida, os homogenatos obtidos foram então centrifugados por 10 minutos a 10° C e 10000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415R). A porção sobrenadante de cada amostra foi coletada, posta em tubos de microcentrífuga e submetida à secagem à vácuo em sistema Speed-Vac, da Thermo Savant (Holbrook, NY) por, no mínimo, 12 horas. Após secagem, os extratos secos foram suspensos em 1 mL de tampão óxido de deutério 99,9% D₂O/ formiato deuterado (Deutero /Sigma-Aldrich), pH 4,1, contendo a referência interna ácido 3-(trimetilsilil)-3,3,2,2-tetradeutério-propiónico (TMSP-d₄ da marca Sigma-Aldrich). Retirou-se o volume correspondente a 200 µL desta solução concentrada, diluindo-a em mais 400 µL de tampão. Por fim, coletou-se os 600 µL obtidos para análise de RMN de ¹H.

Neste caso, as análises foram feitas para duas situações distintas:

1) Amostras provenientes de carnes seladas à vácuo e armazenadas em freezer biológico (-80°C), em que a pesagem e preparo foram feitos num mesmo dia (amostras denominadas por Frango 0 dias);

2) Amostras provenientes de carnes seladas à vácuo e armazenadas em freezer biológico (-80°C), em que o dia de preparo foi após 7 dias transcorridos o dia da pesagem, ou seja, após armazenamento em geladeira convencional (amostras denominadas por Frango 7 dias).

Desta forma, pretendeu-se observar o perfil de metabólitos polares na carne de frango e relação destes com o tempo de estocagem, simulando o armazenamento em prateleiras de supermercado.

2.3.4. Preparo de Soluções de Padrões para Análise via RMN

Fez-se o preparo de soluções padrão referentes aos seguintes metabólitos: L-carnosina, adenina, hipoxantina, adenosina, inosina, adenosina 5'-trifosfato (ATP), inosina 5'-monofosfato (IMP) e, por fim, uma mistura de todos os citados. Os padrões foram obtidos da Sigma-Aldrich.

As soluções foram feitas por meio da homogeneização das respectivas massas de cada padrão com tampão D₂O/formiato deuterado (Deutero/Sigma-Aldrich), pH 4,1, contendo a referência interna ácido 3-(trimetilsilil)-3,3,2,2-tetradeutério-propiónico (TMSP-d₄ da Sigma-Aldrich), a partir de soluções estoque, obtendo-se soluções finais de concentração 1 mM. Destas, retirou-se o volume correspondente a 600 µL para análise de RMN de ¹H.

2.3.5. Análises via RMN

As análises foram feitas em um espectrômetro Agilent DD2 (Agilent Technologies), com campo de 11,7 Tesla (499,84 MHz para a frequência do Hidrogênio), com calibração do pulso de cada amostra para as quais usou-se os seguintes parâmetros: pulso de $\pi/6$; acúmulo de 64 transientes; pontos complexos totalizando 32768 e tempo de relaxação de 4 s, na obtenção de espectros de ¹H, com supressão do sinal da água em 4,75 ppm, por meio da sequência Presat (AGILENT TECHNOLOGIES, 2011), conforme figura 17.

Figura 17 – Representação da sequência de pulso Presat efetuada pelo equipamento de RMN.

Fonte: Adaptação de Ceribeli (2016) a partir de Agilent Technologies, VnmrJ Software 3.1, 2011.

2.3.6. Processamento dos Dados de RMN e Identificação dos Metabólitos

Os dados foram processados e tratados no software Chenomx Suite 8.0 (Chenomx Inc., Edmonton, AB, Canadá), para fins de ajustes de fase e linha de base, bem como para identificação dos metabólitos, comparando-se estes com o perfil de

RMN dos metabólitos disponíveis na biblioteca do software, tomando como referência a concentração do TMSP-d4 como 1 mM. Quando a identificação via biblioteca de dados do software não era suficiente, recorria-se à comparação do metabólito com o espectro de sua solução padrão, principalmente para os que possuem incidência de sinais na região entre 6 e 9 ppm (aromáticos).

2.3.7. Análises Multivariadas

Na obtenção de dados de todos os espectros expressos como amplitude em função do deslocamento químico, fez-se uso do CRAFT, uma toolbox do software VnmrJ da Agilent Technologies, seguido de análise multivariada.

No caso das análises multivariadas, fez-se uso do software *Weka* e de métodos matemáticos de análise tal como *Information Gain*, em português Ganho de Informação (LIU; MOTODA, 2012), em que o método fornece uma lista ordenada dos sinais dos espectros que são “importantes” por tornar as amostras discriminantes entre si. Posteriormente, visualizou-se os dados com a Análise por Componentes Principais, do inglês *Principal Component Analysis – PCA* (JOLLIFFE, 2002), que permite a visualização de um conjunto de dados multidimensionais, por meio da redução de dimensionalidade de acordo com o sentido de maior desvio padrão entre as amostras.

A figura 18 ilustra todas as etapas referentes a esta parte do trabalho, desde o tratamento dos animais, preparo de amostras, análises via RMN e os métodos empregados no tratamento dos dados com os respectivos softwares utilizados.

Figura 18 – Esquema ilustrativo das etapas desde o tratamento dos animais até o tratamento dos dados, referentes às análises via RMN.

Fonte: Autoria própria.

2.3.8. Preparo das Amostras de Carne de Frango para Análise via RPE

Porções de aproximadamente 0,9 g de carne de peito de frango foram homogeneizadas em 6 mL de tampão MES (ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico/Sigma-Aldrich), pH 5,7, usando o sistema Ultra-turrax (Ultra Stirrer Modelo Ultra 80). Em seguida, foram adicionados 400 µL de solução PBN (Sigma-Aldrich) de concentração 320 mM em etanol (AppliChem Panreac), aos homogenatos obtidos. Alíquotas de 1 mL destas misturas foram distribuídas em um total de 4 tubos de microcentrífuga. Estes, foram incubados a uma temperatura de $(65,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ por diferentes intervalos de tempo (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 h) e, em seguida, centrifugados por 10 minutos a 10°C e a 10000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415R). Após resfriadas, as soluções foram analisadas por RPE.

2.3.9. Análises via RPE

As soluções obtidas foram transferidas a um capilar de quartzo de 50 µL (Blaubrand Intramark) alocado no interior da cavidade de um espectrômetro de RPE Bruker, modelo EMXplus (Rheinstetten, Alemanha) por meio de um sistema em fluxo usando-se uma bomba peristáltica e cânulas de teflon de diâmetro 1 mm. Os espectros de RPE dessas soluções foram obtidos a temperatura ambiente e os parâmetros utilizados no experimento foram: campo magnético central de 3480 G, com varredura de 100 G, amplitude de modulação de 1 G e potência de micro-ondas de 10 mW. Fez-se o acúmulo de 16 varreduras para cada espectro.

As duas situações de análises distintas para as carnes preparadas a 0 e 7 dias de armazenamento na geladeira (conforme descrito anteriormente também foram efetuadas).

2.3.10. Tratamento dos Dados de RPE

No tratamento destes resultados, fez-se uso do software Win EPR Processor da Bruker, em que tomou-se a integral dupla dos espectros obtidos, considerando-se apenas o primeiro sinal.

2.3.11. Análises das Taxas de Formação de Radicais

A partir dos valores obtidos na etapa anterior, plotou-se os gráficos de intensidade relativa de RPE versus tempo, no software Phyton, os quais permitiram

uma análise da cinética das reações, ou seja, da taxa de formação de radicais de acordo com o tempo de incubação e ajuste de funções para explicar o comportamento das curvas.

A figura 19 ilustra todas as etapas referentes a esta parte do trabalho, desde o tratamento dos animais, preparo de amostras, análises via RPE e os métodos empregados no tratamento dos dados com os respectivos softwares utilizados.

Figura 19 – Esquema ilustrativo das etapas desde o tratamento dos animais até o tratamento dos dados, referentes às análises via RPE.

Fonte: Autoria própria.

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Ressonância Magnética Nuclear

Com o intuito de ressaltar possíveis diferenças e semelhanças entre os espectros obtidos, apresenta-se a seguir (figura 20) os espectros de RMN de ^1H da amostra de um animal que não teve a dieta suplementada com antioxidantes (a) e de um animal com dieta suplementada no nível máximo de extrato de erva-mate (b).

Figura 20 - Espectros de RMN de ^1H com uma amostra de frango do T1 – 0 mg de antioxidantes/ Kg de ração (espectro (a) em azul) e uma amostra do T6 – 1000 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração (espectro (b) em marrom), ambas do grupo denominado por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento).

Os perfis qualitativos dos espectros obtidos para ambas as amostras de carne de frango foram similares quanto ao padrão de metabólitos (quantidade de sinais e o deslocamento químico), diferindo apenas quanto à intensidade relativa dos sinais, o que demonstra que há maior ou menor quantidade de um metabólito em relação aos outros, variando em função do tratamento. Uma vez que a diferença é apenas quantitativa e não qualitativa, podemos atribuí-la aos níveis distintos de extrato de erva-mate a que os animais foram submetidos.

Com o intuito de avaliar o perfil da carne armazenada proveniente de animais suplementados com diferentes teores de extrato de erva-mate na dieta e verificar uma possível alteração na sua estabilidade química, as carnes foram estocadas numa geladeira doméstica (com temperatura média de 5° C), simulando-se um

armazenamento em condições comerciais. Os resultados dos espectros das carnes estocadas durante 7 dias na geladeira convencional podem ser vistos na figura 21.

Figura 21 - Espectros de RMN de ^1H de uma amostra de frango do T1 – 0 mg de antioxidantes/ Kg de ração (espectro (a) em azul) e uma amostra do T6 – 1000 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração (espectro (b) em marrom), ambas do grupo denominado por Frango 7 dias (com tempo de armazenamento).

A mesma relação observada entre os espectros da classe denominada por Frango 0 dias, também se manteve para a classe denominada por Frango 7 dias. Os perfis dos espectros da dieta com 0 mg de antioxidantes/ Kg de ração como o dos animais submetidos à dieta com nível máximo de 1000 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração foram iguais. Nenhum metabólito distinto dos que haviam sido identificados nos espectros referentes às amostras sem tempo de estocagem na geladeira foi detectado, apenas uma variação do teor dos componentes em função do armazenamento. Assim, pode-se afirmar que o perfil metabólico para animais da classe Frango 0 dias e da classe Frango 7 dias são análogos.

2.4.2. Identificação dos metabólitos

Para os sinais mais intensos obtidos nos espectros de RMN de ^1H , fez-se a atribuição dos possíveis metabólitos presentes nas amostras, de acordo com a figura 22. Uma vez que, conforme descrito anteriormente, não houve diferença entre a forma e as regiões de ocorrência dos sinais nos espectros, escolheu-se aleatoriamente o

espectro de um animal dentre os 18, neste caso pertencente ao grupo T1, para classificação.

Figura 22 – Espectro de ^1H de RMN referente a uma amostra do T1 – 0 mg de antioxidantes/ Kg de ração, com atribuição dos sinais.

Atribuição dos sinais: (1) TMSP-d4; (2) isoleucina, leucina, valina e treonina; (3) e (12) lactato; (4) alanina; (5) leucina, isoleucina, acetato, glutamato, metionina, valina; (6) metionina, β -alanina, anserina, carnosina; (7) e (11) creatina; (8) anserina, carnosina, creatinina, β -alanina, taurina, betaína; (9) taurina, glicina, treonina, valina, isoleucina, leucina, glutamato, alanina, inosina; (10) anserina, metionina, betaína; (13) treonina, ATP, inosina, creatinina, carnosina, anserina; (14) água; (15) inosina; (16) ATP; (17) carnosina e anserina; (18) inosina e anserina; (19) inosina, formiato, ATP; (20) carnosina, ATP.

A maioria dos metabólitos identificados para o espectro tomado por base (figura 22) são aminoácidos ou dipeptídeos. Segue descrição de cada um deles com suas respectivas fórmulas estruturais na tabela 2.

Tabela 2 – Descrição das fórmulas químicas estruturais e demais parâmetros de RMN dos metabólitos identificados na carne de frango referentes à figura 22.

Nome	Fórmula Estrutural	Sinal (correspondente à figura 22)	Deslocamento Químico (ppm) dos H ligados aos C identificados pelas letras	Multiplicidade do Sinal (calculados de acordo com a equação 3)	Intensidade Relativa	Acoplamento (Hz) (calculado de acordo com a equação 4)
Acetato		5	a:2,05	a:singlete	a:3	-
Adenosina Trifosfato/ Adenosina Difosfato/ Adenosina Monofosfato		13; 16; 19 e 20	a:8,52; b:8,24; c:4,80; d:4,38; e:6,13; f:4,52; g:4,26	a:singlete; b:singlete; c:triplete (suprimido pela saturação do sinal da água); d:multipeto; e:dublete; f:duplo dublete (não visualizável); g:multipeto	a:1; b:1; c:1; d:1; e:1; f:1; g:2	Jec=5,75; Jce=5,75
Alanina		4 e 9	a:3,78; b:1,47	a:quarteto; b:dublete	a:1; b:3	Jab=7,25; Jba=7,25 (continua)

Nome	Fórmula Estrutural	Sinal (correspondente à figura 22)	Deslocamento Químico (ppm) dos H ligados aos C identificados pelas letras	Multiplicidade do Sinal (calculados de acordo com a equação 3)	Intensidade Relativa	(continuação) Acoplamento (Hz) (calculado de acordo com a equação 4)
Anserina		6; 8; 10; 13; 17 e 18	a:7,26; b:8,22; c:3,85; ; d:3,09; e:4,51; f:2,68; g:3,23	a: dublete (não visualizável); b:dublete (não visualizável); c:singlete; d:duplo dublete (contido no multipeto); e:duplo dublete (contido no multipeto); f:multipeto; g:multipeto	a:1; b:1; c:3; d:2; e:1; f:2; g:2	Jde ^{1,2} =8,88; Jde ^{1,3} =15,75;
β-Alanina		6 e 8	a:2,64; b:3,20	a:triplete (contido no multipeto); b:triplete (contido no multipeto)	a:2; b:2	Jab=6,70; Jba=6,70
Betaina		8 e 10	a:3,89; b:3,25	a:singlete (contido no dublete); b:singlete (contido no multipeto)	a:2; b:9	-
Carnosina		6; 8; 13; 17 e 20	a:3,24; b:2,68; c:4,48; d:3,10; e:7,09; f:8,21	a:duplo triplete (contido no multipeto); b:duplo triplete (contido no multipeto); c:duplo dublete (contido no multipeto); d:duplo dublete (contido no multipeto); e:singlete; f:singlete	a:2; b:2; c:1; d:2; e:1; f:1	Jdc ^{1,2} = 8,29; Jdc ^{1,3} = 15,34;

Nome	Fórmula Estrutural	Sinal (correspondente à figura 22)	Deslocamento Químico (ppm) dos H ligados aos C identificados pelas letras	Multiplicidade do Sinal (calculados de acordo com a equação 3)	Intensidade Relativa	(continuação) Acoplamento (Hz) (calculado de acordo com a equação 4)
Creatina		7 e 11	a:3,93; b:3,03	a:singlete; b:singlete	a:2; b:3	-
Creatinina		8 e 13	a:4,26; b:3,12	a:singlete; b:singlete	a:2; b:3	-
Formiato		19	a:8,40	a:singlete	a:1	-
Glicina		9	a:3,56	a:singlete	a:2	-
Glutamato		5 e 9	a:3,77; b:2,08 e 2,16; c:2,43 e 2,49	a:duplo dubleto (contido no multipletto); b:multipletos; c:multipletos	a:1; b:2; c:2	-

Nome	Fórmula Estrutural	Sinal (correspondente à figura 22)	Deslocamento Químico (ppm) dos H ligados aos C identificados pelas letras	Multiplicidade do Sinal (calculados de acordo com a equação 3)	Intensidade Relativa	(continuação) Acoplamento (Hz) (calculado de acordo com a equação 4)
Inosina		9; 13; 15; 18 e 19	a:6,09; b:3,83 e 3,90; c:4,25; d:4,42; e:4,79; f:8,22; g:8,34;	a:dublete; b: dois duplos dubletos (não visualizáveis); c:duplo tripleto (não visualizável); d:duplo dublete (não definido); e:tripleto (região de saturação do sinal da água); f:singlete; g:singlete	a:1;b: 2; c:1; d:1; e:1;f: 1; g:1	Jae=5,67;
Isoleucina		2; 5 e 9	a:3,67; b:1,97; c:1,25 e 1,46; d:0,93; e:1,00	a:dublete; b: multipeto; c:multipletos; d:tripleto (contido no multipeto); e:dublete (contido no multipeto)	a:1; b:1; c:2; d:3; e:3	Jab=4,20; Jdc=7,32; Jeb=7,07
Lactato		3 e 12	a:4,20; b:1,35	a:quarteto; b:dublete	a:1; b:3	Jab=6,95; Jba=6,95
Leucina		2, 5 e 9	a:0,94; b:0,96; c:1,70; d:1,73; e:3,73	a:dublete (contido no "tripleto" aparente); b:dublete (contido no "tripleto" aparente); c:multipeto; d:multipeto; e:multipeto	a:3,0; b: 3,0; c:1; d:2; e:1	Jac=6,50; Jbc=5,25

Nome	Fórmula Estrutural	Sinal (correspondente à figura 22)	Deslocamento Químico (ppm) dos H ligados aos C identificados pelas letras	Multiplicidade do Sinal (calculados de acordo com a equação 3)	Intensidade Relativa	Acoplamento (Hz) (calculado de acordo com a equação 4)
Metionina		5, 6, e 10	a:3,85; b:2,17; c:2,63; d:2,12	a:duplo dublete (não identificável); b:multipeto; c:triplete (contido no multipeto); d:singlete (contido no multipeto)	a:1; b:2; c:2; d:3	Jcb=7,60
Taurina		8 e 9	a:3,26; b:3,42	a:triplete (contido no multipeto); b:triplete	a=2; b=2	Jab=6,50; Jba=6,50
TMSP-d4 (padrão interno)		1	a:0	a:singlete	a:9	-
Treonina		2, 9 e 13	a:3,60; b:4,25; c:1,32	a:dublete; b:duplo quarteto (contido no multipeto e não visualizável); c:dublete	a:1; b:1; c:3	Jab=5,00; Jcb=6,60;
Valina		2 e 9	a:0,98; b:1,03; c:2,27; d:3,62	a:dublete (contido no multipeto); b: dublete; c:duplo duplo quarteto (não visualizável); d:dublete	a:3; b:3; c: 1; d:1	Jac=6,95; Jbc=7,10; Jdc=4,27; (conclusão)

Conforme descrito, os metabólitos foram identificados com base na atribuição dos sinais no espectro de RMN de ^1H e, quando necessário, através da adição de padrão. Foram identificados um total de 20 metabólitos distintos nas amostras de carne de frango, muitos deles com propriedades antioxidantes conforme descreve-se a seguir.

O acetato, por sua vez, corresponde a um ácido orgânico comumente encontrado na carne, tal qual o lactato e outros ácidos orgânicos. Esse metabólito consiste em um dos principais produtos finais da fermentação microbiana do intestino (RINTTILÄ; APAJALAHTI, 2013; HOOPER; MIDTVEDT; GORDON, 2002). A formação deste tipo de ácido graxo de cadeia curta leva à redução do pH intestinal em frangos, servindo como inibidor da proliferação de bactérias patogênicas sensíveis ao mesmo (RINTTILÄ; APAJALAHTI, 2013; VAN DER WIELEN et al., 2000).

O ATP/ ADP/ AMP, respectivamente adenosina trifosfato, adenosina difosfato e adenosina monofosfato, são metabólitos cujas funções relacionam-se com a produção, armazenamento e gasto energético. Toda a energia necessária para o funcionamento do organismo provém de referidas moléculas e, no caso da carne, as mesmas estão intimamente envolvidas no processo de contração muscular (OWUSU-APENTEN, 2004). Essas moléculas são mencionadas conjuntamente, uma vez que, para o espectro de RMN de ^1H , o grupo contendo os fosfatos dificilmente gera sinal detectável, pois os hidrogênios das hidroxilas ligadas aos átomos de fósforo trocam rapidamente, dando lugar a núcleos de deutério que, no caso, não exprimem sinal na ressonância. Assim, o espectro correspondente à adenosina é similar para todas as três espécies, a mono, a di e a trifosfato.

Detectou-se os metabólitos anserina e carnosina, dois dipeptídeos específicos da carne (BEAUCLERCQ et al., 2016), metabolizados a partir da β -alanina (HARRIS et al., 2006; DERAIVE et al., 2010; CULBERTSON et al., 2010). São encontrados naturalmente em altas concentrações no cérebro e músculo de diversos animais, bem como no homem. Tratam-se de conhecidos antioxidantes endógenos, que atuam como captadores de radicais (GUIOTTO, 2005), além de possuírem propriedades como eficientes agentes quelantes de íons cobre no organismo (BEAUCLERCQ et al., 2016; KOHEN, 1988) e proteção contra radiação gama, esta que pode acarretar danos oxidativos ao DNA (KOHEN, 1988; SHANKEL, 2013). Pesquisas demonstraram que a carnosina é um eficiente desativador de oxigênio singlete, além de reduzir

determinadas reações proteolíticas associadas ao envelhecimento celular (JAYASENA et al., 2015). A carnosina é um dipeptídeo constituído de histidina e beta-alanina. Uma vez que a disponibilidade de β -alanina no músculo é menor que a concentração de histidina, pode-se dizer que a β -alanina é o fator limitante para a síntese de carnosina no músculo esquelético (SALE; SAUNDERS; HARRIS, 2010). Há relatos de que a β -alanina é relacionável com uma melhora do desempenho muscular do animal, principalmente quando consumida em concomitância com creatina CULBERTSON et al., 2010).

Alanina e glicina também identificados, são dois aminoácidos glicogênicos (BEAUCLERCQ et al., 2016). Tratam-se de aminoácidos que, ao sofrerem degradação, têm como produto moléculas precursoras da glicose, tal como o piruvato (BEAUCLERCQ et al., 2016). A alta quantidade de alanina no músculo pode ser um sinônimo de maior catabolismo de aminoácidos como fonte de energia, em um contexto de falta de energia fornecida por carboidratos (BEAUCLERCQ et al., 2016). Já a glicina está envolvida na biossíntese da creatina. Esta, por sua vez, tem papel na produção de energia responsável por uma melhora no desempenho muscular do animal (BEAUCLERCQ et al., 2016; SILVA et al., 2009; PURCHAS et al., 2004), além de ser precursora da creatinina, que é formada a partir da conversão não enzimática da creatina através da eliminação de água e ciclização (WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000).

Taurina e betaína são aminoácidos que induzem e regulam a síntese de antioxidantes. A Taurina atua desde neurotransmissora no cérebro, estabilizadora de membranas celulares e facilitadora no transporte de íons. Este beta-aminoácido também estabiliza o gradiente de pH mitocondrial através de suas propriedades tampão (BEAUCLERCQ et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2010; HANSEN et al., 2010). Betaína aumenta as defesas antioxidantes via regulação do metabolismo de aminoácidos sulfurados. Altos níveis de betaínas podem aumentar a síntese de cisteína, e consequentemente, a produção de glutatona. Em músculos de frango, a betaína pode também aumentar a atividade da principal enzima antioxidante (glutatona peroxidase), bem como a catalase e a superóxido dismutase, aumentando, portanto, a proteção contra peroxidação lipídica (BEAUCLERCQ et al., 2016; JUNG et al., 2013; ALIREZAEI et al., 2015; ALIREZAEI et al., 2012).

O formiato presente nos espectros, provavelmente decorre da própria solução tampão utilizada. De acordo com a literatura, não parece ser recorrente esse metabólito em carne (STRAADT; AASLYNG; BERTRAM, 2014; BEAUCLERCQ et al., 2016).

O metabólito glutamato decorrente do ácido glutâmico também foi identificado. O glutamato é reconhecido por ser o transmissor mais importante para o funcionamento normal do cérebro (PURVES, et al., 2001). É um substrato para a síntese de proteínas, precursor anabólico para crescimento dos músculos, regulador do equilíbrio ácido-base no rim e, além disso, que assegura o transporte de nitrogênio inter-órgãos (NEWSHOLME et al., 2003).

A inosina consiste num produto de degradação da inosina monofosfato (IMP). Enquanto a primeira é relacionável com o sabor azedo e amargo, a última é considerada um importante intensificador de aroma na carne (FLORES et al., 1999; MUROYA et al., 2014).

O lactato, metabólito também presente, é relacionável com a estabilidade da cor na carne. Concentrações elevadas de lactato supõem maiores níveis de NADH e, conseqüentemente, uma maior estabilidade da coloração cárnea (KIM et al., 2013). Como já citado anteriormente, o lactato presente na carne é decorrente do ácido láctico formado durante o processo de glicólise anaeróbica.

Os aminoácidos leucina, isoleucina e valina também foram identificados. tratam-se de amino ácidos de cadeias ramificadas (do inglês Branched Chain Amino Acids - BCAA) com estruturas semelhantes e essenciais para o ser humano (LETTO; BROSNAN; BROSNAN, 1986). A leucina destaca-se como reguladora da síntese de proteínas musculares (CHURCHWARD-VENNE et al., 2012), bem como a isoleucina, aminoácido com marcantes características anabólicas que age como um elemento iniciador da síntese proteica (WILKINSON et al., 2013). A valina por sua vez, é um aminoácido essencial para o ser humano que também se encontra envolvido no processo de biossíntese proteica. Os dois últimos podem ser convertidos a glicose no organismo, diferentemente da leucina (LETTO; BROSNAN; BROSNAN, 1986).

A metionina, outro aminoácido essencial para os seres humanos, também figura nos espectros identificados. Sua molécula contém enxofre e, por isso, é fundamental no metabolismo de substâncias que contêm este elemento químico (USUDA; KURAHASHI, 2005).

A Treonina, também identificada, é um aminoácido relacionado com a biossíntese de proteínas. É essencial para os seres humanos e sintetizado a partir do aspartato por meio de bactérias como *Escherichia coli* (DEBABOV, 2003). Trata-se de um aminoácido também essencial para as aves, cujos níveis mais elevados de concentração estão no coração, músculos, esqueleto e sistema nervoso central. Além de ser indispensável para formação de proteínas, auxilia a formação de colágeno, elastina e também na formação de anticorpos. Também é um aminoácido relacionado com a manutenção e formação dos ovos (SÁ et al., 2007).

2.4.3. Análises Multivariadas

Ainda com base nas análises de RMN obtidas referentes às amostras denominadas por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento), foi efetuada a análise multivariada dos dados. Aplicou-se primeiramente o método do ganho de informação para cada espectro tratado, de tal forma que o mesmo selecionou as regiões mais discriminantes entre cada um dos espectros, ou seja, as regiões que melhor permitiam diferenciar um espectro do outro. Após, aplicou-se a PCA resultando, por fim, nos dados apresentados na figura 23.

Observa-se claramente a ocorrência de agrupamentos distinguindo cada tipo de tratamento. Tais agrupamentos se deram de forma natural dentro do método aplicado e, inclusive, mostram uma relação com os níveis de tratamento com extrato de erva-mate ao qual os animais foram submetidos.

No caso dos grupos formados, os que possuem maior índice de coesão dentre os tratamentos com extrato de erva-mate são o dos animais referentes aos tratamentos 3 e 5.

Os dados do animal denominado por A, pertencente ao tratamento 4, foi eliminado das análises multivariadas, uma vez que no PCA, o mesmo apresentava-se como *outlier*. Somado a isso, seu espectro de RMN de ^1H se apresentou fora do padrão quando comparado aos espectros registrados para as demais amostras.

Figura 23 – Gráficos das PCAs referentes ao tratamento dos dados dos espectros de RMN dos animais do grupo denominado por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento); (a) PCA1 x PCA2; (b) PCA1 x PCA3 e (c) PCA1 x PCA2 x PCA3.

Quanto aos sinais selecionados pelo método do ganho de informação, seguem os gráficos de aranhas (figura 24) que representam a relevância dos sinais considerados para distinção das amostras. A leitura de referido gráfico deve ser feita no sentido anti-horário.

Figura 24 – Gráficos de aranha referentes aos tratamentos de T1 a T6 para o grupo denominado por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento) feitos a partir dos dados obtidos com o método do ganho de informação. Unidades do gráfico para os sinais em ppm com sentido de prioridade anti-horário; intensidade do sinal no sentido radial.

Conforme citado anteriormente, a partir dos espectros de RMN das 17 amostras (excluindo o animal A do tratamento 4), o método do ganho de informação efetuou a seleção dos sinais que eram mais eficientes na diferenciação destes e, com base nisso, o gráfico de aranhas foi gerado. É importante ressaltar que, o método do ganho de informação discrimina os sinais separadamente, ou seja, compara as classes dos tratamentos com cada sinal isoladamente. Desta forma, é calculado um valor que representa a capacidade de um dado sinal de separar as amostras nos tratamentos. De acordo com a representação gráfica de aranhas, tem-se que, para cada tratamento, um sinal ou um conjunto de sinais, mostrou-se predominante. Isto significa que há diferença entre sinais que são considerados discriminantes entre diferentes tratamentos, mas que esses sinais são coerentes dentro de um mesmo tratamento. Assim, as análises efetuadas comprovam que animais submetidos a uma mesma dieta e, conseqüentemente, a um mesmo teor de extrato de erva-mate, apresentam um mesmo padrão metabólico.

No caso do tratamento 1 é possível destacar os sinais em 2,64 ppm (correspondente aos metabólitos β -alanina e anserina); 3,22 ppm (metabólito não atribuído); 3,77 ppm (referente à alanina) e 3,85 ppm (referente à anserina).

Para o tratamento 2 é possível destacar os sinais em 4,51 ppm (correspondente à ATP/ADP/AMP); para um dos animais, no caso o animal A, o sinal 2,70 ppm (caracterizado pela carnosina) e 3,85 ppm (referente à anserina).

No tratamento 3 os sinais que se mostraram predominantes foram: 2,64 ppm (identificado como β -alanina e anserina) para um dos animais apenas (animal A); 4,51 ppm (referente à ATP/ADP/AMP); 2,65 ppm (correspondente à metionina) e 0,94 ppm (relacionado com leucina).

Em relação ao tratamento 4, os únicos sinais em que ocorre concordância para os animais B e C, tratam-se do sinal 2,65 ppm (correspondente à metionina) e 0,94 ppm (correspondente à leucina). O sinal 4,51 ppm (relacionado à ATP/ADP/AMP) e 3,85 ppm (referente à anserina) apenas para o animal B; 3,22 ppm (não atribuído) e 3,72 (sinal não atribuído) apenas para o animal C. A não coerência entre a incidência dos sinais dentro deste grupo já mostra indícios do porquê estas amostras do tratamento 4 são as mais esparsas na representação do PCA e, no caso do animal A, o mesmo não apresenta concordância em intensidade de sinais do espectro com

nenhum dos sinais dos demais animais dentro de seu grupo, o que levou à exclusão de seu ponto do PCA por tratar-se de *outlier*.

No tratamento 5, observou-se uma grande coerência entre os resultados, uma vez que, tanto para os animais A, B como C, os sinais que discriminam esse grupo são apresentados por todos e, inclusive, com intensidades parecidas. Tratam-se dos sinais em 4,51 ppm (correspondente à ATP/ADP/AMP); 3,22 ppm (sinal não atribuído); 2,65 (referente à metionina); 3,77 ppm (correspondente à alanina); 0,94 ppm (referente à leucina) e 3,85 ppm (anserina).

Já no caso do tratamento 6 destacam-se os sinais 2,64 ppm (atribuído à β -alanina e anserina); 4,49 ppm (anserina); 3,22 ppm (não atribuído); sinal em 3,77 (correspondente à alanina) com alta relevância para o animal B e 3,85 ppm (referente à anserina).

Pode-se afirmar que, os metabólitos que foram produzidos relativamente em maiores quantidades (maior intensidade do sinal) são importantes antioxidantes endógenos, tal qual a carnosina e a anserina.

Os tratamentos 5 e 6, de 750 mg e 1000 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração, respectivamente, ou seja, os tratamentos com maiores níveis do extrato da planta mostraram que seus metabólitos discriminantes são similares. Outro ponto importante, é que, tomando-se dois tratamentos extremos, como T1, em que a dieta dos animais foi administrada sem antioxidantes e T5, em que os animais foram alimentados com um dos maiores níveis de mate e que apresentou os resultados mais coerentes, conforme supracitado, observa-se uma relação favorável para a formação de metabólitos de função positiva no organismo. Por exemplo, observa-se que houve maior ocorrência na formação de metabólitos tais como anserina que é um antioxidante endógeno, produção de leucina (que regula a síntese de proteínas musculares), produção de metionina (essencial no metabolismo de substâncias com enxofre) e produção de ATP/ADP/AMP (relacionável com questões energéticas no organismo).

Assim, pode-se inferir que para as amostras denominadas por Frango 0 dias, o tratamento com mate mostrou-se positivo, no sentido de manter metabólitos de interesse para a manutenção da estabilidade redox da carne.

A partir dos dados dos PCAs, obteve-se o gráfico de pesos ou *loadings*, os quais permitem saber os sinais de maior relevância para que se obtenha as devidas

projeções nos eixos das PCs. Seguem as figuras 25, 26 e 27, referentes à PC1, PC2 e PC3, respectivamente.

Figura 25 – Gráfico de *loadings* referente aos metabólitos de maior contribuição para a PC1; dados do grupo denominado por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento).

O gráfico de *loadings* proporciona como informação os deslocamentos químicos com relevância na discriminação das amostras na componente principal. De acordo com a figura 25, observa-se que, para a PC1, os deslocamentos químicos em 3,41 ppm, 2,64 ppm, 4,51 ppm, 3,22 ppm e 2,65 ppm - inferidos como os metabólitos taurina, beta-alanina, anserina, ATP/ADP/AMP e metionina – são os que apresentam maior peso na referida componente. A PC1 agrupa claramente os tratamentos T1 e T6 e explica 29% do total de variância dos dados.

Figura 26 – Gráfico de *loadings* referente aos metabólitos de maior contribuição para a PC2; dados do grupo denominado por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento).

Em concordância com a figura 26, observa-se que para a PC2, os deslocamentos químicos de valores 4,43 ppm, 3,61 ppm, 3,53 ppm, 0,94 ppm e 3,72 ppm - inferidos como os metabólitos inosina, valina, leucina e dois metabólitos desconhecidos, os quais classificou-se como sinal não atribuído - são os que apresentam maior peso em referida componente. A PC2 parece contribuir apenas para agrupar as amostras referentes ao tratamento 4, deixando-o nitidamente separado dos demais. Referida componente explica 25% do total de variância dos dados.

No caso da PC3 (figura 27), os deslocamentos químicos de valores 2,70 ppm, 0,94 ppm, 3,85 ppm, 0,91 ppm e 3,22 ppm - inferidos como os metabólitos carnosina, leucina, anserina, isoleucina - são os que apresentam maior peso na PC. Aparentemente, a PC3 parece contribuir apenas para agrupar os tratamentos T5 e T6 do agrupamento formado pelo tratamento T3. Por fim, o eixo PC3 representa 14% do total de variância dos dados e projeção do PCA.

Figura 27 – Gráfico de *loadings* referente aos metabólitos de maior contribuição para a PC3; dados do grupo denominado por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento).

O mesmo procedimento de análise adotado para a classe denominada por Frango 0 dias foi seguido na análise da classe Frango 7 dias. Procedeu-se com a análise multivariada, gerando os gráficos dos PCAs.

Conforme figura 28, observa-se a formação de agrupamentos distinguindo cada tipo de tratamento. No caso dos grupos formados, os que possuem maior índice de semelhança são o dos animais referentes aos tratamentos T1, T2, T4 e T5. Salientando-se que os tratamentos 1 e 2 são os da dieta sem adição de antioxidantes e com adição de vitamina E (acetato de tocoferol), respectivamente, os melhores agrupamentos obtidos dentro dos tratamentos com adição de extratos de erva-mate na ração, tratam-se dos de número 4 e 5.

Figura 28 – Gráficos das PCAs referentes ao tratamento dos dados dos espectros de RMN dos animais do grupo denominado por Frango 7 dias (com tempo de armazenamento); (a) PCA1 x PCA2; (b) PCA1 x PCA3 e (c) PCA1 x PCA2 x PCA3.

Uma vez que, para aplicar os PCAs, recorreu-se primeiramente ao método do ganho de informação para que o mesmo seleccionasse os sinais discriminantes entre amostras, seguem tais dados seleccionados automaticamente por referido método (figura 29).

Figura 29 – Gráficos de aranha referentes aos tratamentos de T1 a T6 para o grupo denominado por Frango 7 dias (com tempo de armazenamento) feitos a partir dos dados obtidos com o método do ganho de informação. Unidades do gráfico para os sinais em ppm com sentido de prioridade anti-horário; intensidade do sinal no sentido radial.

T1 - 0mg de antioxidante/Kg de ração

T2 - 125mg de vitamina E/Kg de ração

T3 - 250mg de mate/Kg de ração

T4 - 500mg de mate/Kg de ração

T5 - 750mg de mate/Kg de ração

T6 - 1000mg de mate/Kg de ração

— Animal A
— Animal B
— Animal C

Analogamente ao ocorrido com os dados referentes à classe dos Frangos 0 dias, a representação gráfica de aranhas para os Frangos 7 dias mostra-nos que um sinal ou conjunto de sinais predomina. Novamente, a análise comprova similaridades entre as amostras de um mesmo tratamento.

Para o tratamento 1, foi possível destacar os sinais em 4,53 ppm (atribuído à ATP/ADP/AMP); 4,50 ppm (relacionado com carnosina) e 3,77 ppm (referente à alanina).

No caso do tratamento 2, observou-se os sinais em 4,53 ppm (atribuído à ATP/ADP/AMP); 4,50 ppm (relacionado com carnosina); 3,77 ppm (referente à alanina) e 1,73 ppm (referente à leucina).

O tratamento 3 apresentou os sinais 4,53 ppm (atribuído à ATP/ADP/AMP); 3,79 ppm (correspondente a glutamato e alanina); 4,50 ppm (relacionado com carnosina) e 3,77 ppm (referente à alanina).

Para o tratamento 4, os sinais que se destacam são 4,53 ppm (atribuído à ATP/ADP/AMP); 4,50 ppm (relacionado com carnosina); 3,77 ppm (referente à alanina) e 1,73 ppm (correspondente à leucina). Além disso, a semelhança na intensidade com as quais os sinais se apresentaram foi muito representativa, mostrando que os metabólitos que caracterizam este tratamento foram muito assertivos para todos os animais.

Para o tratamento 5, os sinais 4,53 ppm (atribuído à ATP/ADP/AMP); 3,79 ppm (correspondente a glutamato e alanina); 4,50 ppm (relacionado com carnosina) e 3,77 ppm (referente à alanina) mostraram predominância.

Para o tratamento 6, os sinais prevalentes foram 4,53 ppm (atribuído à ATP/ADP/AMP); 3,79 ppm (correspondente a glutamato e alanina); 3,07 ppm (referente à anserina); 4,50 ppm (relacionado com carnosina); 3,77 ppm (referente à alanina) e 1,73 ppm (referente à leucina).

No caso dos tratamentos 4 e 5 que apresentaram melhores resultados, os metabólitos que se destacam são carnosina (antioxidante endógeno), alanina e ATP/ADP/AMP, este último relacionado com a produção e armazenamento energético. Isto demonstra que, um dos metabólitos que foi importante para diferenciar as amostras entre si, possui atividade antioxidante. Vale ressaltar que, o sinal de valor 3,92 ppm (correspondente à creatina e inosina) aparece em todos os tratamentos, no entanto, para todos os grupos, este é o sinal de menor intensidade. Tal fato é

interessante, já que como explicado anteriormente, a inosina é relacionada com sabor indesejado na carne. Outra observação é que o sinal 1,73 ppm (referente à leucina) para todos os tratamentos sempre teve um animal que o apresentasse com menor intensidade em relação aos outros dois animais. Observa-se também que no caso da estocagem em geladeira, a ocorrência de alguns metabólitos parece se influenciar pela incidência de outros.

Os gráficos de *loadings* revelam-nos a importância de cada sinal no momento do agrupamento das amostras (tratamentos distintos), para que se produzisse o resultado visualizado nas PCAs. Seguem referidos gráficos nas figuras 30, 31 e 32.

Figura 30 – Gráfico de *loadings* referente aos metabólitos de maior contribuição para a PC1; dados do grupo denominado por Frango 7 dias (com tempo de armazenamento).

De acordo com o gráfico dos *loadings* (figura 30), o eixo PC1, representa 56% do total de variância dos dados na projeção do PCA. Desta maneira, todos os sinais presentes sugerem aproximadamente um mesmo peso e, assim, uma mesma contribuição para a PC1. Dentre estes, os que apresentam maior agrupamento são

T1 e T2. Os metabólitos inferidos de acordo com os sinais identificados são: carnosina, anserina, leucina, ATP/ADP/AMP, alanina, glutamato, creatina e inosina.

Figura 31 – Gráfico de *loadings* referente aos metabólitos de maior contribuição para a PC2; dados do grupo denominado por Frango 7 dias (com tempo de armazenamento).

Observa-se que para a PC2 (figura 31), os deslocamentos químicos de valores 3,77 ppm, 3,79 ppm, 4,53 ppm 4,50 ppm - inferidos como os metabólitos alanina, glutamato, ATP/ADP/AMP e carnosina -, são os que apresentam maior peso na PC2. Além disso, a PC2 serve para agrupar nitidamente os tratamentos T1, T2 e T5 e separá-los dos demais. Referida componente explica 17% do total de variância dos dados.

Por fim, de acordo com a figura 32, os deslocamentos químicos 3,92 ppm, 3,07 ppm, 4,53 ppm, 4,50 ppm e 3,79 ppm – correspondentes aos metabólitos inferidos como creatina, inosina, anserina, ATP/ADP/AMP, carnosina, glutamato e alanina – são os que mais contribuem para a projeção no eixo PC3. Desta forma, esta

componente explica 13% do total de variância dos dados na projeção do PCA e é útil no agrupamento das amostras do tratamento T2 e distinção destas dos demais tratamentos.

Figura 32 – Gráfico de *loadings* referente aos metabólitos de maior contribuição para a PC3; dados do grupo denominado por Frango 7 dias (com tempo de armazenamento).

2.4.4. Ressonância Paramagnética de Elétrons

Em complementariedade às análises feitas via RMN, efetuou-se os experimentos de RPE igualmente para todas as amostras, cujo intuito foi o de verificar a taxa de formação de radicais e a possível relação que poderia ser estabelecida em detrimento das distintas dietas. Seguem os espectros obtidos (figura 33) para um dos dados (referente ao tempo de incubação de 3 h antecedente à análise). Destacam-se dois espectros, correspondentes ao tratamento sem adição de extrato de erva-mate na dieta, T1 e de um animal do tratamento T6, com o maior nível de extrato de erva-mate suplementado em sua dieta.

Figura 33 – Espectros de RPE de uma amostra de frango do T1 – 0 mg de antioxidantes/ Kg de ração (a) e uma amostra do T6 – 1000 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração (b), ambas do grupo denominado por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento).

O perfil do espectro mostra-nos que ocorre reação de captação do radical pelo spin-trapping PBN, formando uma espécie aduto radical mais estável (figura 34). Tal espécie foi monitorada via análise por RPE, de forma que os espectros obtidos para todos os animais apresentam um mesmo perfil, diferindo apenas quanto à intensidade do sinal. A intensidade relaciona-se com a quantidade de radicais formados e, de fato, esperava-se que a mesma fosse distinta, de acordo com os diferentes tratamentos.

Figura 34 – Reação do spin trapping PBN com uma espécie radical formando uma espécie aduto radical.

Fonte: Autoria própria.

Demais parâmetros importantes como o padrão de desdobramento (tal qual o apresentado na figura 33) de triplo dubleto e os valores de $A_N=16,0$ G e $A_H=3,34$ G (dados de acordo com a equação 6) e $g_{iso} = 2,01458$ mantiveram-se para ambos os espectros da figura 33 e demais. Este espectro em particular, é característico de radicais centrados no C aprisionados pelo PBN (BUETTNER, 1987), o que nos permite inferir que os radicais em questão se tratam, possivelmente, de espécies deste tipo.

A figura 35 ilustra os espectros obtidos para os animais pertencentes à classe Frango 7 dias (referente ao tempo de incubação de 3 h antecedente à análise). Destacam-se dois espectros correspondentes ao tratamento sem adição de extrato de erva-mate na dieta, T1 e de um animal do tratamento T6, com o maior nível de extrato de erva-mate suplementado em sua dieta.

Figura 35 – Espectros de RPE de uma amostra de frango do T1 – 0 mg de antioxidantes/ Kg de ração (a) e uma amostra do T6 – 1000 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração (b), ambas do grupo denominado por Frango 7 dias (com tempo de armazenamento).

Conforme esperado, o mesmo perfil de espectro obtido para os animais da classe Frango 0 dias foi obtido para os da classe Frango 7 dias. Parâmetros similares de A_H , A_N e g_{iso} que caracterizam os espectros, bem como o padrão de desdobramento se mantiveram, sugerindo espécies similares aprisionadas.

2.4.5. Taxas de Formação de Radicais

Como forma de organizar os dados de RPE obtidos, procedeu-se com uma análise da taxa de formação de radicais no tempo. Assim, foi observado qual o comportamento das soluções incubadas por diferentes tempos a uma mesma temperatura, em relação a uma maior ou menor formação de espécies aduto radicais. Neste caso, primeiramente fez-se a integral do espectro originalmente obtido. Em seguida, considerou-se a integral apenas do primeiro sinal. Fez-se a média de tais valores, uma vez que, para cada tratamento havia 3 animais. Por fim, normalizou-se cada valor anteriormente obtido, dividindo-o pelo valor de maior intensidade média de RPE, de maneira que, a partir destes últimos valores, fez-se os gráficos de análise relativa desta intensidade em função do tempo. A figura 36 e 37 ilustram os gráficos correspondentes.

Figura 36 – Gráfico da taxa relativa de formação de radicais para os animais de T1 a T6 do grupo denominado por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento). Os pontos representam os dados reais e as linhas tracejadas representam as curvas que descrevem as funções ajustadas de acordo com cada perfil de pontos reais.

Os dados tratados mostraram curvas de perfis semelhantes que, no entanto, diferem umas das outras quanto às inclinações que descrevem seus crescimentos.

Figura 37 – Gráfico da taxa relativa de formação de radicais para os animais de T1 a T6 do grupo denominado por Frango 7 dias (com tempo de armazenamento). Os pontos representam os dados reais e as linhas tracejadas representam as curvas que descrevem as funções ajustadas de acordo com cada perfil de pontos reais.

No caso das análises das amostras pertencentes à classe Frango 7 dias, o comportamento do gráfico manteve-se similar ao descrito pela figura 36, conforme é possível confirmar na figura 37.

A função matemática ajustada para as curvas de ambos os gráficos se trata de uma função exponencial (crescimento). A seguir, tem-se a explanação das análises química (figura 38) e matemática efetuadas, com os cálculos resumidos.

Figura 38 – Esquema representativo do ciclo de autoxidação para reações em cadeia envolvendo radicais e rota alternativa com uso de PBN resultando em reação consecutiva.

Fonte: Autoria própria.

A partir da figura 38, do ciclo de peroxidação lipídica, nota-se que a reação em cadeia que se desenvolveria em ausência de PBN seria a do substrato (espécie A) formando radical (espécie B) numa primeira etapa denominada início (mediada pela constante de velocidade k_1). Em seguida, com introdução do oxigênio molecular, a espécie B reagiria com este, mediado pela constante de velocidade k_{O_2} , até formar produtos intermediários, etapa esta denominada por propagação. Estes, consequentemente formariam produtos primários (P) na etapa denominada por término.

No entanto, observa-se pela figura o surgimento de uma rota alternativa. Trata-se da introdução do PBN. Este muda o curso das reações em cadeia, fazendo com que ocorra reações consecutivas onde, a partir do substrato (A), tem-se a formação do radical (B) mediado pela constante k_1 . Então, a partir de B e do PBN (presente em excesso), ocorre a formação de aduto radical (C), num processo mediado pela constante k_2 . As constantes de velocidade k_{O_2} como k_2 são ambas de grande magnitude (da ordem de $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, para a adição de O_2 e entre $10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, para a reação com o PBN), no entanto, o fator determinante neste caso para que a reação de formação do produto C seja priorizada, é o fato do PBN ser adicionado em grandes quantidades (320 mM), fazendo com que não seja possível a competição entre as constantes. A figura 39 resume o conteúdo acima descrito.

Figura 39 – Resumo da reação consecutiva que se desenvolve devido adição do PBN.

Fonte: Autoria própria

Com base nisto, partindo das equações (7), (8) e (9) que seguem, foi possível descrever um modelo cinético que explica o comportamento das curvas (descrita pela equação 15).

Montando-se a equação da taxa de consumo para cada espécie, tem-se

$$\begin{cases}
 \frac{dA}{dt} = -k_1 \cdot [A] & (7) \\
 \frac{dB}{dt} = k_1 \cdot [A] - k_2 \cdot [B] & (8) \\
 \frac{dC}{dt} = k_2 \cdot [B] & (9)
 \end{cases}$$

Sendo a integral da equação (7) igual a

$$[A] = [A_0] \cdot e^{-k_1 t} \quad (10)$$

e substituindo-se a equação (10) na equação (8), decorre a equação diferencial

$$\frac{dB}{dt} + k_2 \cdot [B] = k_1 \cdot [A_0] \cdot e^{-k_1 t}, \quad (11)$$

cuja solução é dada por

$$[B] = \frac{k_1}{k_2 - k_1} \{e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}\} \cdot [A_0]. \quad (12)$$

Uma vez que

$$[C] = [A_0] - [B] - [A], \quad (13)$$

substituindo as equações (10) e (12) na equação (13) obtém-se

$$[C] = \left(1 + \frac{k_1 \cdot e^{-k_2 t} - k_2 \cdot e^{-k_1 t}}{k_2 - k_1}\right) \cdot [A_0]. \quad (14)$$

Como $k_2 \gg k_1$, o que implica que k_1 é a etapa limitante na formação de radicais, então, finalmente

$$S_{RPE} \cong [C] = \{1 - e^{-k_1 t}\} \cdot [A_0], \quad (15)$$

onde S_{RPE} trata-se do sinal de RPE, $[C]$ corresponde à concentração de aduto radical, que por sua vez é proporcional aos valores de intensidade do sinal de RPE; A_0 é uma constante de valor 1; t é a variável de tempo e k a constante que permite avaliar a taxa de crescimento das curvas, ou seja, o quão rápido ou lento é o crescimento das mesmas.

Nesta análise, o interesse se volta para o valor da constante k , que representa a constante de velocidade observada. A tabela 3 apresenta os valores obtidos para k , referentes aos animais das classes Frango 0 dias e Frango 7 dias.

Tabela 3 – Valores obtidos para as constantes de velocidade observadas referentes cada tratamento; dados referentes aos grupos de animais denominados por Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento) e Frango 7 dias (com tempo de armazenamento).

Tratamentos	0 dias	7 dias
	k (min ⁻¹)	k (min ⁻¹)
T1 – 0 mg de antioxidantes/ Kg de ração	0,034 ± 0,003	0,033 ± 0,005
T2 – 125 mg de Vitamina E/ Kg de ração	0,017 ± 0,002	0,040 ± 0,009
T3 – 250 mg de erva-mate/ Kg de ração	0,039 ± 0,003	0,028 ± 0,004
T4 – 500 mg de erva-mate/ Kg de ração	0,017 ± 0,002	0,032 ± 0,002
T5 – 750 mg de erva-mate/ Kg de ração	0,016 ± 0,001	0,020 ± 0,002
T6 – 1000 mg de erva-mate/ Kg de ração	0,021 ± 0,001	0,033 ± 0,004

Desta maneira, para os resultados referentes às amostras da classe Frango 0 dias podemos classificá-los da seguinte forma: $k_{T5} < k_{T4} < k_{T2} < k_{T6} < k_{T1} < k_{T3}$. O maior valor obtido para a constante k corresponde ao tratamento T3, enquanto o menor valor obtido para essa constante corresponde ao tratamento T5. O resultado corrobora com a taxa de crescimento da curva do gráfico da figura 36, em que a curva do tratamento 5 é a de menor valor e, portanto, de menor taxa de radicais formados para os tempos em questão. Tal afirmação implica que se menos adutos radicais foram detectados, também menos radicais foram formados ou tiveram sua ação neutralizada, o que consequentemente, pode ser atribuído à ação de antioxidantes e presença destes em maiores concentrações na dieta.

Uma vez que os dados de RMN também demonstraram um melhor agrupamento entre as amostras dos animais para este tratamento (T5) e que os metabólitos responsáveis pela semelhança entre essas amostras são benéficos, em sua maioria com propriedades antioxidantes ou que induzem a produção destes, então é possível inferir que o tratamento com erva-mate foi positivo propiciando menores concentrações de radicais. Menores taxas de formação de radicais levam a uma carne menos vulnerável à oxidação, em se tratando de armazenamento nos supermercados.

Vale ressaltar que, a segunda curva que demonstra menor taxa de formação de radicais se trata da relativa aos tratamentos T4 e T2, também de adição com mate e vitamina E (acetato de tocoferol), respectivamente. No caso da vitamina E, os resultados são coerentes, pois esta também possui propriedades antioxidantes, dentre outros efeitos benéficos no tratamento de aves.

Em relação aos resultados contidos na tabela 3 referentes aos animais da classe denominada Frango 7 dias, é possível fazer a seguinte classificação: $k_{T5} < k_{T3} < k_{T6} < k_{T4} < k_{T1} < k_{T2}$. Observa-se novamente que, analogamente ao ocorrido para o caso das amostras denominadas por Frango 0 dias, para as amostras estocadas por 7 dias consecutivos em geladeira, o tratamento que se mostrou mais eficiente quanto à menor produção de radicais foi o T5. O tratamento T1, sem nenhum tipo de antioxidante mostrou-se como o segundo pior, enquanto o tratamento T2 que foi adicionado com vitamina E, diferentemente do ocorrido para os denominados por Frango 0 dias, mostrou-se o pior quanto à inibição na formação de radicais. Seria

coerente que o valor de k_{T2} observado para o tratamento T2 fosse menor em relação ao k_{T1} do tratamento T1, diferentemente do que fora supracitado, uma vez que o tratamento T1 não possui adição de nenhum tipo de antioxidante. Este fenômeno talvez possa se justificar pelo fato de que, como a carne ficou estocada, o antioxidante vitamina E foi consumido. Desta forma, quando findaram os 7 dias de armazenamento na geladeira, grande parte dele já havia sido gasto e não podia mais promover efeito antioxidante quando da realização do experimento. Esses resultados corroboram com os trabalhos de Cadenas e Sies (1998) e Wagner Buettner e Burns (1996) que relatam a atividade da vitamina E contra a oxidação lipídica. A vitamina E é um antioxidante de parada de reação, ou seja, que suprime a oxidação durante a etapa denominada *lag phase* ou fase de latência. Terminada referida fase, tendo sido consumido todo o antioxidante disponível, o sistema inicia então a fase de propagação (neste caso de radicais ou de oxidação lipídica e decréscimo dos antioxidantes), em que a oxidação do sistema procede numa mesma taxa com a qual se daria o crescimento das espécies radicalares sem a presença de qualquer antioxidante. Por fim, na fase de término, há a quebra de hidroperóxidos lipídicos formando produtos secundários. Assim, pode-se dizer que a estocagem em geladeira durante 7 dias promoveu o consumo dos níveis de vitamina E refletindo na ausência de antioxidantes nessas carnes.

Por fim, a comparação entre a concentração dos antioxidantes presentes nas amostras do tratamento T2 Frango 0 dias são mais altas que das amostras do tratamento T2 Frango 7 dias, o que pode levar à afirmação de que o consumo dos antioxidantes no caso das amostras da classe de 7 dias deve-se, de fato, à estocagem.

Aparentemente, no caso da classe Frango 7 dias, com exclusão do tratamento T5, os demais tratamentos com erva-mate parecem não apresentar diferenças significativas entre os valores de k , ficando todos numa faixa de valores aproximados de 0,3. Isto pode levar à conclusão de que, a estocagem em geladeira levou à depleção dos antioxidantes. Deste modo, no momento da incubação para realização dos experimentos de RPE, os radicais que se formam têm menor quantidade de antioxidantes que possam impedir sua ação, explicando o progresso acelerado de radicais.

Ao contrário do que se possa intuir, o tratamento com o nível máximo de erva-mate (1000 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração) denominado por tratamento T6, parece não ser o mais indicado em dietas de frangos, quando o objetivo se trata de utilizar as propriedades antioxidantes do extrato desta planta. Tal fato talvez se justifique por alguma rota metabólica que pode ocorrer no organismo destes animais e que não seja favorável quanto à manutenção dos antioxidantes de maneira proporcional àquela com a qual o extrato de erva-mate é adicionado na dieta.

Comparando os dados de RPE da classe Frango 0 dias com os da classe Frango 7 dias, é possível perceber que as taxas de crescimento das constantes de velocidade observadas nos gráficos referentes aos animais da primeira classe foram menores que no outro caso, com exceção dos dois últimos tratamentos de maior taxa de formação de radicais, que na classe 0 dias (k_{T1} e k_{T2}) são ligeiramente maiores que na classe 7 dias (k_{T1} e k_{T3}). Os dados de RMN de ^1H mostram que as concentrações dos antioxidantes endógenos de interesse (carnosina e anserina) e o precursor de um deles, como é o caso da β -alanina, apresentam menores concentrações para os espectros das classes Frango 7 dias em relação à classe Frango 0 dias. Por fim, como os dados de RPE estão em concordância com os de RMN, então pode-se afirmar que:

a) Em geral, o mate apresentou efeito positivo, principalmente para as carnes não submetidas a condições de armazenamento em geladeira convencional durante 7 dias;

b) Tanto para as carnes Frango 0 dias como Frango 7 dias, o tratamento T5 mostrou-se mais adequado, com nível de extrato de erva-mate adicionado de 750 mg / Kg de ração, uma vez que as PCAs, os gráficos de aranha e mesmo as constantes de velocidade decorrentes das análises de RPE observadas para a classe Frango 0 dias apresentaram um valor relativo baixo (aproximadamente $0,016 \text{ min}^{-1}$) e da classe Frango 7 dias também apresentou um valor relativo baixo (aproximadamente $0,020 \text{ min}^{-1}$) quando comparados com os demais tratamentos. Isto indica que este tratamento em específico com extrato de erva-mate, pode ser viável e eficiente em se tratando de alternativas para melhorar a qualidade da carne submetida às condições comerciais de estocagem, propiciando menor oxidação desta, com possível conservação de suas propriedades químicas.

3 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos para a investigação do perfil metabólico e da estabilidade oxidativa da carne de frangos que tiveram sua dieta adicionada com diferentes níveis de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Os animais objeto de estudo, foram submetidos a dietas controle (sem antioxidantes – T1), adicionadas com vitamina E (acetato de tocoferol – T2), e com distintos teores de extrato de erva-mate, T3, T4, T5 e T6.

Por meio destas amostras, efetuaram-se análises via Ressonância Magnética Nuclear, com o intuito de investigar similaridades e diferenças no padrão de metabólitos polares contidos na carne dos animais. Através da técnica de Ressonância Paramagnética de Elétrons, com uso de armadilha química PBN, verificou-se a tendência e a taxa de formação de radicais nas carnes. As classes de análise foram divididas em amostras referentes à carne sem tempo de armazenamento (Frango 0 dias) e com tempo de estocagem de 7 dias em geladeira convencional à temperatura de 5°C (Frango 7 dias), simulando as condições comerciais em supermercado.

Observou-se que o perfil dos espectros de RMN de ^1H para as amostras de carne de animais suplementados ou não com extrato de erva-mate não apresentam diferenças qualitativas quanto ao padrão dos metabólitos polares. Os resultados também permitiram concluir que uma maior concentração de metabólitos polares com propriedades antioxidantes, tal como os peptídeos anserina e carnosina e seus precursores metabólicos, são encontrados nas amostras de carnes provenientes dos animais suplementados com extrato de mate. De todos os tratamentos aplicados, o tratamento T5 correspondente a 750 mg de extrato de erva-mate suplementado/ Kg de ração, infere ser o que promove melhores efeitos, tanto da classe denominada por Frango 0 dias como da classe denominada por Frango 7 dias.

Os dados referentes à utilização da Ressonância Paramagnética de Elétrons mostraram que, animais submetidos a dietas contendo extratos de erva-mate apresentam uma menor taxa de formação de radicais, quando comparados a animais alimentados segundo dietas sem este tipo de aditivo, sugerindo que estas amostras apresentam uma maior resistência a oxidação. Em concordância com os dados de RMN, o tratamento que apresentou menor valor de constante de velocidade e, conseqüentemente, menor taxa de formação de radicais, foi o tratamento T5, com

valor de constante de velocidade observada de $0,016 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$ (para a classe Frango 0 dias) e $0,020 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$ (para a classe Frango 7 dias).

Em relação à comparação das classes designadas por Frango 0 dias e Frango 7 dias, foi possível verificar que tanto no caso dos dados de Ressonância Magnética Nuclear, como Ressonância Paramagnética de Elétrons, o armazenamento em geladeira comercial durante o período de 7 dias compromete a concentração de antioxidantes presentes na carne. É observado uma depleção destes metabólitos e como impacto, as amostras de carne apresentam maiores valores de constantes de velocidade para a formação de radicais, sugerindo um produto com menor estabilidade oxidativa.

Diferentemente do que era esperado, o tratamento T6 referente ao nível máximo de extrato de erva-mate contido na ração, de 1000 mg de extrato de erva-mate/ Kg de ração não figurou como o que promoveu efeitos mais positivos em relação à dieta de frangos de corte.

Por fim, é possível afirmar que a suplementação com extratos de erva-mate em dietas de frangos é benéfica, propiciando um maior teor de metabólitos que asseguram propriedades antioxidantes, bem como que retardam a formação de radicais, sugerindo uma maior estabilidade oxidativa da carne, maior tempo de exposição em prateleira em se tratando do aspecto econômico desta, e um produto mais saudável, em relação aos aspectos nutricionais.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. R. A.; BOARI, C. A.; PIRES, A. V.; PINHEIRO, S. R. F.; OLIVEIRA, R. G. D.; OLIVEIRA, K. M. D.; GONÇALVES, F. M.; OLIVEIRA, F. R. Influência do sexo e idade de abate sobre rendimento de carcaça e qualidade da carne de codornas de corte. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 15, n. 1, p. 131-140, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-99402014000100020>. Acesso em: 05 maio 2016.

AGILENT TECHNOLOGIES. **Project for VnmrJ**. Version 3.1: project planning software. [S.l.]: 2011.

AGILENT TECHNOLOGIES. **VnmrJ 3.1**. Experimente guide. Santa Clara, 2011. 234 p. Disponível em: <<http://www.emory.edu/NMR/docs/VnmrJ%203%201%20Exp%20Guide%205990-7603EN.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

ALIKARIDIS, F. Natural constituents of Ilex species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, n. 2, p. 121-144, 1987. Doi: 10.1016/0378-8741(87)90084-5.

ALIREZAEI, M.; KHOSHDEL, Z.; DEZFOULIAN, O.; RASHIDIPOUR, M.; TAGHADOSI, V. Beneficial antioxidant properties of betaine against oxidative stress mediated by levodopa/benserazide in the brain of rats. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 65, n. 3, p. 243-252, 2015. Doi: 10.1007/s12576-015-0360-0.

ALIREZAEI, M.; REZA GHEISARI, H.; REZA RANJBAR, V.; HAJIBEMANI, A. Betaine: a promising antioxidant agent for enhancement of broiler meat quality. **British Poultry Science**, v. 53, n. 5, p. 699-707, 2012. Doi: 10.1080/00071668.2012.728283.

ALONSO, A.; MARSAL, S.; JULIÀ, A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. 23, p. 1-20, 2015. Doi: 10.3389/fbioe.2015.00023.

AUGUSTO, O. **Radicais livres**: bons, maus e naturais. São Paulo: Oficina de textos, 2006. 115 p.

BARBOSA, S. B. P. UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO. Artigo. **Zootecnia**: a ciência do novo século. Recife, 2016. Disponível em: <http://ww4.ufrpe.br/artigo_ver.php?idConteudo=1257>. Acesso em: 23 abr. 2016.

BARBUT, S. Problem of pale soft exudative meat in broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 38, n. 4, p. 355-358, 1997. Doi: 10.1080/00071669708418002.

BEAUCLERCQ, S.; NADAL-DESBARATS, L.; HENNEQUET-ANTIER, C.; COLLIN, A.; TESSERAUD, S.; BOURIN, M.; BIHAN-DUVAL, E. L.; Berri, C. Serum and muscle metabolomics for the prediction of ultimate pH, a key factor for chicken-meat quality. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 4, p. 1168-1178, 2016. Doi: 10.1021/acs.jproteome.5b01050.

BOLUMAR, T.; ANDERSEN, M. L.; ORLIEN, V. Antioxidant active packaging for chicken meat processed by high pressure treatment. **Food Chemistry**, v.129, n. 4, p. 1406-1412, 2011. Doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.082.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A. G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378-384, 2011. Doi: 10.1016/j.jep.2010.06.032.

BUETTNER, G. R. Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 3, n. 4, p. 259-303, 1987. Doi: 10.1016/S0891-5849(87)80033-3.

CADENAS, E.; SIES, H. The lag phase. **Free Radical Research**, v. 28, n. 6, p. 601-609, 1998. Doi: 10.3109/10715769809065816.

CAMPOS, A.M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E.A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 7, n. 1, p. 43-49, 1996.

CAPOZZI, F.; BORDONI, A. Foodomics: a new comprehensive approach to food and nutrition. **Genes & Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 1-4, 2013. Doi: 10.1007/s12263-012-0310-x.

CARDOZO JUNIOR, E.L.; FERRARESE-FILHO, O.; CARDOZO FILHO, L.; FERRARESE, M. D. L. L.; DONADUZZI, C.M.; STURION, J.A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 7, p. 553-558, 2007. Doi: 10.1016/j.jfca.2007.04.007.

CHURCHWARD-VENNE, T. A.; BURD, N. A.; MITCHELL, C. J.; WEST, D. W.; PHILP, A.; MARCOTTE, G. R.; BAKER, S. K.; BAAR, K.; PHILLIPS, S. M. Supplementation of a suboptimal protein dose with leucine or essential amino acids: effects on myofibrillar protein synthesis at rest and following resistance exercise in men. **The Journal of physiology**, v. 590, n. 11, p. 2751-2765, 2012. Doi: 10.1113/jphysiol.2012.228833.

CIFUENTES, A. Food analysis: present, future, and foodomics. **ISRN Analytical Chemistry**, v. 2012, article ID 801607, p. 1-16, 2012. Doi: 10.5402/2012/801607.

COLQUHOUN, I. J. Use of NMR for metabolic profiling in plant systems. **Journal of Pesticide Science**, v. 32, n. 3, p. 200-212, 2007. Doi: 10.1584/jpestics.R07-03.

CORPET, D.E. Red meat and colon cancer: should we become vegetarians, or can we make meat safer? **Meat Science**, v. 89, n. 3, p. 310-316, 2011. Doi: 10.1016/j.meatsci.2011.04.009.

CULBERTSON, J. Y.; KREIDER, R. B.; GREENWOOD, M.; COOKE, M. Effects of beta-alanine on muscle carnosine and exercise performance: A review of the current literature. **Nutrients**, v. 2, n. 1, p. 75-98, 2010. Doi: 10.3390/nu2010075.

DEBABOV, V. G. The threonine story. In: Microbial Production of L-Amino Acids. Moscow: Springer Berlin Heidelberg, 2003. v. 79, p. 113-136.

DERAVE, W.; EVERAERT, I.; BEECKMAN, S.; BAGUET, A. Muscle carnosine metabolism and β -alanine supplementation in relation to exercise and training. **Sports Medicine**, v. 40, n. 3, p. 247-263, 2010. Doi: 10.2165/11530310-000000000-00000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Suínos e Aves. Brasil, 2012. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves>>. Acesso em: 23 jan. 2012.

FARIA, P. B. **Desempenho e qualidade de carcaça e carne de frangos criados em sistema alternativo**. 2007. 239 f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimento, Área de Concentração em Qualidade de Carne) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

FIEHN, O.; KOPKA, J.; DORMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHERWEY, R.N.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotechnology**, v. 18, n.11, p. 1157-1161, 2000. Doi: 10.1038/81137.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774-778, 2001.

FILIP, R.; FERRARO, G. E. Researching on new species of "Mate": *Ilex brevicuspis*: phytochemical and pharmacology study. **European Journal of Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 50-54, 2003. Doi: 10.1007/s00394-003-0399-1.

FLETCHER, D. L.; QIAO, M.; SMITH, D. P. The relationship of raw broiler breast meat color and pH to cooked meat color and pH. **Poultry Science**, v. 79, n. 5, p. 784-788, 2000. Disponível em: <<http://ps.oxfordjournals.org/content/79/5/784.long>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

FLORES, M.; ARMERO, E.; ARISTOY, M. C.; TOLDRÁ, F. Sensory characteristics of cooked pork loin as affected by nucleotide content and post-mortem meat quality. **Meat Science**, v. 51, n. 1, p. 53-59, 1999.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **World Food Outlook 2012**. Brasil, 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 24 set. 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2015-2024**. Brasil, 2015. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf>>. Acesso em: 08 maio 2016.

FORATO, L. A.; FARIA, M. A. D. S.; MANZANO, R. M.; TULLIO, R. R.; CRUZ, G. M.; COLNAGO, L. A. **Análise do perfil de ácidos graxos no contra-filé bovino pela RMN de ¹³C em alta resolução**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2009. p. 1-13. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/658240/1/BPD262009.pdf>>. Acesso em: 03 set. 2014.

FUHRER, T.; ZAMBONI, N. High-throughput discovery metabolomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 31, p. 73-78, 2015. Doi: 10.1016/j.copbio.2014.08.006.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações**. 2 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987. 1012 p.

GNOATTO, S.C.; DASSONVILLE-KLIMPT, A.; DA NASCIMENTO, S.; GALÉRA, P.; BOUMEDIENE, K.; GOSMANN, G.; SONNET, P.; MOSLEMI, S. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1865-1877, 2008. Doi: 10.1016/j.ejmech.2007.11.021.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, n. 2, p. 338-344, 1996. Doi: 10.1006/bbrc.1996.1030.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A.J. Low-density-lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 35, n. 1, p. 47-56, 1995.

GUIOTTO, A.; CALDERAN, A.; RUZZA, P.; BORIN, G. Carnosine and carnosine-related antioxidants: A review. **Current Medicinal Chemistry**, v.12, n. 20, p. 2293-2315, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HANSEN, S. H.; ANDERSEN, M. L.; CORNETT, C.; GRADINARU, R.; GRUNNET, N. A role for taurine in mitochondrial function. **Journal of Biomedical Science**, v. 17, Suppl 1: S23, p. 1-8, 2010. Doi: 10.1186/1423-0127-17-S1-S23.

HARRIS, R.C.; TALLON, M. J.; DUNNETT, M.; BOOBIS, L.; COAKLEY, J.; KIM, H. J.; FALLOWFIELD, J. L.; HILL, C. A.; SALE, C.; WISE, J. A. The absorption of orally supplied β -alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. **Amino Acids**, v. 30, n. 3, p. 279-289, 2006. Doi: 10.1007/s00726-006-0299-9.

HECK, C.I.; DE MEJIA, E.G. Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x.

HERRERO, M.; GARCÍA-CAÑAS, V.; SIMO, C.; CIFUENTES, A. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics. **Electrophoresis**, v. 31, n. 1, p. 205-228, 2010. Doi: 10.1002/elps.200900365.

HERRERO, M.; SIMÓ, C.; GARCÍA-CAÑAS, V.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 31, n. 1, p. 49-69, 2012. Doi: 0.1002/mas.20335.

HILLE. Mapa de carnes. **Mapa do frango**. Joinville, 2016. Disponível em: <<http://www.hillecarnes.com.br/mapa-de-carnes/mapa-de-carnes-de-aves/>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

HONG, Y. S. NMR-based metabolomics in wine science. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, n. S1, p. S13-S21, 2011. Doi: 10.1002/mrc.2832.

HOOPER; MIDTVEDT; GORDON. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. **Annual review of nutrition**, v. 22, n. 1, p. 283-307, 2002. Doi: 10.1146/annurev.nutr.22.011602.092259.

HUFF-LONERGAN, E.; LONERGAN, S. M. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. **Meat science**, v. 71, n. 1, p. 194-204, 2005. Doi: 10.1016/j.meatsci.2005.04.022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da extração vegetal e da silvicultura**. Rio de Janeiro, v. 29, 2014. 56 p. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2014_v29.pdf>. Acesso em: 03 ago. 2016.

ISHIKAWA, S.; TAMAKI, S.; OHATA, M.; ARIHARA, K.; ITOH, M. Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells *via* hydrogen peroxide produced by hemoxygenase: A possible mechanism of heme-induced colon cancer. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 8, p. 1182-1191, 2010. Doi: 10.1002/mnfr.200900348.

IUPAC GOLD BOOK. **Radical (free radical)**. Oxford, 2014. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/R05066.html>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

JANZEN, E. G. Spin trapping. *Accounts of Chemical Research*, v. 4, n. 1, p. 31–40, 1971. Doi: 10.1021/ar50037a005.

JAYASENA, D. D.; JUNG, S.; BAE, Y. S.; PARK, H. B.; LEE, J. H.; JO, C. Comparison of the amounts of endogenous bioactive compounds in raw and cooked meats from commercial broilers and indigenous chickens. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 37, p. 20-24, 2015. Doi: 10.1016/j.jfca.2014.06.016.

JOLLIFFE, I. T. **Principal component analysis**. 2 ed. Aberdeen: Springer, 2002. 487 p.

JUDGE, M.; ABERLE, E.; FORREST, H. **Principles of meat science**. Iowa: Kendall Hunt, 1989. 351p.

JUNG, Y. S.; KIM, S. J.; KWON, D. Y.; AHN, C. W.; KIM, Y. S.; CHOI, D. W.; KIM, Y. C. Alleviation of alcoholic liver injury by betaine involves an enhancement of antioxidant defense via regulation of sulfur amino acid metabolism. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 292-298, 2013. Doi: 10.1016/j.fct.2013.08.049.

JUSBASIL. **Paraná é o maior produtor de erva-mate do País, diz IBGE**. Paraná, 2007. Disponível em: < <http://gov-pr.jusbrasil.com.br/noticias/312552/parana-e-o-maior-produtor-de-erva-mate-do-pais-diz-ibge>>. Acesso em: 07 maio 2016.

KEPPLER, A. F., **Estudo de mecanismos de reações envolvendo compostos de telúrio e aplicações sintéticas de compostos calcogenados**. 2009. 112 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

KIM, J.; PARK, Y.; LEE, S.-H.; PARK, Y. trans-10,cis-12 Conjugated linoleic acid promotes bone formation by inhibiting adipogenesis by peroxisome proliferator activated receptor- γ -dependent mechanisms and by directly enhancing osteoblastogenesis from bone marrow mesenchymal stem cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.24, n. 4, p. 672–679, 2013. Doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.03.017.

KIND, T.; TOLSTIKOV, V.; FIEHN, O.; WEISS, R.H. A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer. **Analytical Biochemistry**, v. 363, n.2, p. 185-195, 2007. Doi: 10.1016/j.ab.2007.01.028.

KOHEN, R.; YAMAMOTO, Y.; CUNDY, K. C.; AMES, B. N. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 9, p. 3175-3179, 1988.

KRISHNAN, P.; KRUGER, N. J.; RATCLIFFE, R. G. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, p. 255-265, 2005. Doi: doi:10.1093/jxb/eri010.

LEAL, A. S.; KRAMBROCK, K.; GUEDES, K.; RODRIGUES, R. R. Ressonância paramagnética eletrônica-RPE aplicada à análise de especiarias irradiadas (com radiação gama). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 427-430, 2004.

LENZ, E.M.; BRIGHT, J.; KNIGHT, R.; WILSON, I.D.; MAJOR, H. A metabonomic investigation of the biochemical effects of mercuric chloride in the rat using ^1H NMR and HPLC-TOF/MS: time dependant changes in the urinary profile of endogenous metabolites as a result of nephrotoxicity. **Analyst**, v. 129, n. 6, p. 535-541, 2004. Doi: 10.1039/b400159c.

LETTO, J.; BROSNAN, M. E.; BROSNAN, J. T. Valine metabolism Gluconeogenesis from 3-hydroxyisobutyrate. **Biochemical Journal**, v. 240, n. 3, p. 909-912, 1986.

LI, J.V.; WANG, Y.; SARIC, J.; NICHOLSON, J.K.; DIRNHOFER, S.; SINGER, B.H.; TANNER, M.; WITTLIN, S.; HOLMES, E.; UTZINGER, J. Global metabolic responses of NMRI mice to an experimental Plasmodium berghei infection. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 9, p. 3948-3956, 2008. Doi: 10.1021/pr800209d.

LIBARDI, S. H. **Cinética e mecanismo de redução de espécies de ferro-heme hipervalentes pelo H₂S, cisteína e CO em relação à proteção do trato gastrointestinal e a qualidade da carne**. 2014. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências – Área de Concentração Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

LIU, H.; MOTODA, H. **Feature selection for knowledge discovery and data mining**. New York: Springer Science & Business Media, 2012. v. 454.

LUND, M.N.; HVIID, M.S.; SKIBSTED, L.H. The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. **Meat Science**, v. 76, n. 2, p. 226-233, 2007. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.11.003>.

LUND, M.N.; HEINONEN, M.; BARON, C.P.; ESTÉVEZ, M. Protein oxidation in muscle foods: A review. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 1, p. 83-95, 2011. Doi: 10.1002/mnfr.201000453.

MARIA, R. M. **Análise do ácido linoléico conjugado em carne bovina por RMN**. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA).
Animal. Espécies. Aves. Brasil, 2012. Disponível em:
<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>. Acesso em: 23 jan. 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA).
Animal. Espécies. Aves. Brasil, 2016. Disponível em:
<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>. Acesso em: 23 abr. 2016.

MORAES, T. B; COLNAGO, L. A. Simulação de sinais de RMN através das equações de Bloch. **Química Nova**, v.37, n. 8, p. 1410-1416, 2014. Doi: 10.5935/0100-4042.20140210.

MUROYA, S.; OE, M.; NAKAJIMA, I.; OJIMA, K.; CHIKUNI, K. CE-TOF-MS-based metabolomic profiling revealed characteristic metabolic pathways in postmortem porcine fast and slow type muscles. **Meat Science**, v. 98, n. 4, p. 726-735, 2014.

NEWSHOLME, P.; LIMA, M. M. R.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T. C.; DOI, S. Q.; BAZOTTE, R. B.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 2, p. 153-163, 2003.

OLIVEIRA, M. W. S.; MINOTTO, J. B.; OLIVEIRA, M. R. D.; ZANOTTO-FILHO, A., BEHR, G. A.; ROCHA, R. F.; MOREIRA, J. C. F.; KLAMT, F. Scavenging and antioxidant potential of physiological taurine concentrations against different reactive oxygen/nitrogen species. **Pharmacological Reports**, v. 62, n. 1, p. 185-193, 2010.

OWUSU-APENTEN, R. K. **Introduction to food chemistry**. Boca Raton: CRC, 2004. 703 p.

PAN, M. H.; LAI, C. S.; HO, C. T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. **Food & Function**, v. 1, n. 1, p. 15-31, 2010. Doi: 10.1039/c0fo00103a.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 263-269, 2012. Doi: 10.1038/nrm3314.

PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. **Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products**. Dordrecht: Springer Science + Business Media, 1994. 500 p.

PICONE, G.; MEZZETTI, B.; BABINI, E.; CAPOCASA, F.; PLACUCCI, G.; CAPOZZI, F. Unsupervised principal component analysis of NMR metabolic profiles for the assessment of substantial equivalence of transgenic grapes (*Vitis vinifera*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 9271-9279, 2011a. Doi: 10.1021/jf2020717.

PICONE, G.; ENGELSEN, S.B.; SAVORANI, F.; TESTI, S.; BADIANI, A.; CAPOZZI, F. Metabolomics as a powerful tool for molecular quality assessment of the fish *Sparus aurata*. **Nutrients**, v. 3, n. 2, p. 212-227, 2011b. Doi: 10.3390/nu3020212.

PRATA, L.F. **Higiene e inspeção de carnes, pescado e derivados**. Jaboticabal: FUNEP, 1999. 217p.

PRAXEDES, C. I. S. **Exsudação de gel no cozimento em carne de peito de frango normal, “PSE” e “DFD”**. 2007. 57 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Área de concentração Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.

PREMA D.; PILFOLD J. L.; KRAUCHI J.; CHURCH J. S.; DONKOR K. K.; CINEL B. Rapid determination of total conjugated linoleic acid content in select Canadian cheeses by ¹H NMR spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 41, p. 9915-9921, 2013. Doi: 10.1021/jf402627q.

PURCHAS, R. W.; RUTHERFURD, S. M.; PEARCE, P. D.; VATHER, R.; WILKINSON, B. H. P. Concentration in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q₁₀ and creatine. **Meat Science**, v. 66, n. 3, p. 629-637, 2004. Doi: 10.1016/S0309-1740(03)00181-5.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L. C.; LAMANTIA, A. S.; MCNAMARA, J. O.; WILLIAMS, S. M. **Neuroscience**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2001. 728 p.

QIAO, M.; FLETCHER, D. L.; SMITH, D. P.; NORTHCUTT, J. K. The effect of broiler breast meat color on pH, moisture, water-holding capacity, and emulsification capacity. **Poultry Science**, v. 80, n. 5, p. 676-680, 2000. Doi: 10.1093/ps/80.5.676.

RACANICCI, A.M.C.; MENTEN, J.F.M.; ALENCAR, S.M.; BUISSA, R.S.; SKIBSTED, L.H. Mate (*Ilex paraguariensis*) as dietary additive for broilers: performance and oxidative stability of meat. **European Food Research and Technology**, v. 232, n. 4, 655-661, 2011. Doi: 10.1007/s00217-011-1432-x.

RAMONI, M. C. **Estudo da fotodegradação de petróleo por ressonância paramagnética eletrônica (RPE)**. 2000. 52 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.

REZZI, S.; RAMADAN, Z.; FAY, L. B.; KOCHHAR, S. Nutritional metabolomics: applications and perspectives. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 2, p. 513-525, 2007. Doi: 10.1021/pr060522z.

RINTTILÄ, T.; APAJALAHTI, J. Intestinal microbiota and metabolites—Implications for broiler chicken health and performance. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 647-658, 2013. Doi: 10.3382/japr.2013-00742.

ROBERTS L. D.; SOUZA A. L.; GERSZTEN R. E.; CLISH C. B. Targeted metabolomics. **Current Protocols in Molecular Biology**, Chapter 30.2, 2012. Doi: 10.1002/0471142727.mb3002s98.

ROÇA, R. D. O. **Composição química da carne**. Botucatu: UNESP, 2012. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/Gestaoetecnologia/Teses/Roca102.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2016.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F. D.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. D. T.; EUCLIDES, R. F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252 p.

SÁ, L. M.; GOMES, P. C.; CECON, P. R.; ROSTAGNO, H. S.; D'AGOSTINI, P. Exigência nutricional de treonina digestível para galinhas poedeiras no período de 34 a 50 semanas de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1846-1853, 2007.

SALE, C.; SAUNDERS, B.; HARRIS, R. C. Effect of beta-alanine supplementation on muscle carnosine concentrations and exercise performance. **Amino acids**, v. 39, n. 2, p. 321-333, 2010. Doi: 10.1007/s00726-009-0443-4.

SARIC, J.; LI, J.V.; WANG, Y.; KEISER, J.; BUNDY, J.G.; HOLMES, E.; UTZINGER, J. Metabolic Profiling of an Echinostoma caproni Infection in the Mouse for Biomarker Discovery. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 7, p. e254, 2008. Doi: 10.1371/journal.pntd.0000254.

SAVORANI, F.; PICONE, G.; BADIANI, A.; FAGIOLI, P.; CAPOZZI, F.; ENGELSEN, S. B. Metabolic profiling and aquaculture differentiation of gilthead sea bream by ^1H NMR metabonomics. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 907-914, 2010. Doi: 10.1016/j.foodchem.2009.10.071.

SCHNEIDER, J. P. **Carne DFD em frangos**. 2004. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos – Área de Bromatologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SCHRIPSEMA, J. Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 14-21, 2010. Doi: 10.1002/pca.1185.

SHANKEL, D. M.; HARTMAN, P. E.; KADA, T.; HOLLAENDER, A.; WILSON, C. M.; KUNY, G. **Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms**. Kansas: Springer Science & Business Media, 2013. v. 39.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SILVA, R. P. D.; NISSIM, I.; BROSNAN, M. E.; BROSNAN, J. T. Creatine synthesis: hepatic metabolism of guanidinoacetate and creatine in the rat in vitro and in vivo. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 2, p. E256-E261, 2009. Doi: 10.1152/ajpendo.90547.2008.

STOUGHTON, R.B.; FRIEND, S.H. Innovation - how molecular profiling could revolutionize drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 4, p. 345-350, 2005. Doi: 10.1038/nrd1696.

STRAADT, I. K.; AASLYNG, M. D.; BERTRAM, H. C. An NMR-based metabolomics study of pork from different crossbreeds and relation to sensory perception. **Meat Science**, v. 96, n. 2, p. 719-728, 2014. Doi: 10.1016/j.meatsci.2013.10.006.

TAKAHASHI, S. E. **Ocorrência de carne pálida e características de qualidade de carne de frangos de corte**. 2007. 86 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

USUDA, Y.; KURAHASHI, O. Effects of deregulation of methionine biosynthesis on methionine excretion in *Escherichia coli*. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3228-3234, 2005. Doi: 10.1128/AEM.71.6.3228-3234.2005.

VAN DER WIELEN, P. W. J. J.; BIESTERVELD, S.; NOTERMANS, S.; HOFSTRA, H.; URLINGS, B. A.; VAN KNAPEN, F. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2536-2540, 2000. Doi: 10.1128/AEM.66.6.2536-2540.2000.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. D. **Características da carne de frango**. Espírito Santo: Pró-Reitoria de Extensão – Programa Institucional de Extensão, 2007. 7 p. (Boletim Técnico - PIE-UFES:01307).

WAGNER, B. A.; BUETTNER, G. R.; BURNS, C. P. Vitamin E slows the rate of free radical-mediated lipid peroxidation in cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 334, n. 2, p. 261-267, 1996.

WILKINSON, D. J.; HOSSAIN, T.; HILL, D. S.; PHILLIPS, B. E.; CROSSLAND, H.; WILLIAMS, J.; LOUGHNA, P.; CHURCHWARD-VENNE, T. A.; BREEN, L.; PHILLIPS, S. M.; ETHERIDGE, T.; RATHMACHER, J. A.; SMITH, K.; SZEWCZYK N. J.; ATHERTON, P. J. Effects of leucine and its metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate on human skeletal muscle protein metabolism. **The Journal of physiology**, v. 591, n. 11, p. 2911-2923, 2013. Doi: 10.1113/jphysiol.2013.253203.

WOELFEL, R. L.; OWENS, C. M.; HIRSCHLER, E. M.; MARTINEZ-DAWSON, R.; SAMS, A. R. The characterization and incidence of pale, soft, and exudative broiler meat in a commercial processing plant. **Poultry Science**, v. 81, n. 4, p. 579-584, 2001. Doi: 10.1093/ps/81.4.579.

WOOD, J. D.; ENSER, M.; FISHER, A. V.; NUTE, G. R. SHEARD, P. R.; RICHARDSON, R. I.; HUGHES, S. I.; WHITTINGTON, F. M. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. **Meat Science**, v. 78, n. 4, p. 343-358, 2008. Doi: 10.1016/j.meatsci.2007.07.019.

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3, p. 1107-1213, 2000.

YANG, Y.; LI, C.; NIE, X.; FENG, X.; CHEN, W.; YUE, Y.; TANG, H.; DENG, F. Metabonomic studies of human hepatocellular carcinoma using high-resolution magic-angle spinning ^1H NMR spectroscopy in conjunction with multivariate data analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 7, p. 2605-2614, 2007. Doi: 10.1021/pr070063h.

ZEOLA, N. M. B. L. Influência da alimentação nas características quantitativas da carcaça e qualitativas da carne de cordeiros Morada Nova. 2002. 65 f.
Dissertação (Mestrado em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

APÊNDICE A – Espectros de RMN e RPE

Espectros de RMN referentes às amostras de um animal escolhido aleatoriamente dentro de cada tratamento. Classe Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento).

Espectros de RMN de ^1H :

T₁A (0 mg de antioxidantes/ Kg de ração)

T₂A (125 mg de vitamina E/ Kg de ração)

Espectros de RMN de ^1H :

T₃B (250 mg de erva-mate/ Kg de ração)

T₄B (500 mg de erva-mate/ Kg de ração)

Espectros de RMN de ^1H :

T₅C (750 mg de erva-mate/ Kg de ração)

T₆C (1000 mg de erva-mate/ Kg de ração)

Espectros de RMN referentes às amostras de um animal escolhido aleatoriamente dentro de cada tratamento. Classe Frango 7 dias (com tempo de armazenamento).

Espectros de RMN de ^1H :

T₁A (0 mg de antioxidantes/ Kg de ração)

T₂A (125 mg de vitamina E/ Kg de ração)

Espectros de RMN de ^1H :

T₃B (250 mg de erva-mate/ Kg de ração)

T₄B (500 mg de erva-mate/ Kg de ração)

Espectros de RMN de ^1H :

T₅C (750 mg de erva-mate/ Kg de ração)

T₆C (1000 mg de erva-mate/ Kg de ração)

Espectros de RMN de ^1H referentes as soluções de padrão:

Espectros de RPE referentes às amostras de um animal escolhido aleatoriamente dentro de cada tratamento. Classe Frango 0 dias (sem tempo de armazenamento).

Espectros de RPE:

T₁A (0 mg de antioxidantes/ Kg de ração)

T₂A (125 mg de vitamina E/ Kg de ração)

Espectros de RPE:

T₃B (250 mg de erva-mate/ Kg de ração)

T₄B (500 mg de erva-mate/ Kg de ração)

Espectros de RPE:

T₅C (750 mg de erva-mate/ Kg de ração)

T₆C (1000 mg de erva-mate/ Kg de ração)

Espectros de RPE referentes às amostras de um animal escolhido aleatoriamente dentro de cada tratamento. Classe Frango 7 dias (sem tempo de armazenamento).

Espectros de RPE:

T₁A (0 mg de antioxidantes/ Kg de ração)

T₂A (125 mg de vitamina E/ Kg de ração)

Espectros de RPE:

T₃B (250 mg de erva-mate/ Kg de ração)

T₄B (500 mg de erva-mate/ Kg de ração)

Espectros de RPE:

T₅C (750 mg de erva-mate/ Kg de ração)

T₆C (1000 mg de erva-mate/ Kg de ração)

APÊNDICE B – Tabela com descrição das dietas administradas para os animais

Dieta Pré-inicial – de 1 a 7 dias de idade

Ingredients	VIT. E mg/kg	YERBA MATE mg/kg				
	250	0	250	500	750	1,000
Corn	51.21	51.21	51.21	51.21	51.21	51.21
Soybean meal 45%	42.55	42.55	42.55	42.55	42.55	42.55
Soybean oil	2.32	2.32	2.32	2.32	2.32	2.32
Dicalcium Phosphate	1.76	1.76	1.76	1.76	1.76	1.76
Limestone	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
Salt	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
DL-Methionine 99%	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29
L-Lysine HCL 78%	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
Inert	0.75	1.00	0.75	0.50	0.25	0.00
Vitamin+Mineral Supplement	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
Choline Chloride 60%	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
L-Threonine 98,5%	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Anticoccidial	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Vitamin E	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Yerba Mate	0.00	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00
Calculated levels						
MEn, Kcal/kg	2,950	2,950	2,950	2,950	2,950	2,950
CP, %	24.16	24.16	24.16	24.16	24.16	24.16

Fonte: RACANICCI, A. M. C., 2015 (slides)⁵. Com permissão de Aline Mondini Calil Racanicci.

⁵ RACANICCI, A. M. C. Animal Performance and Metabolism, Meat Quality, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Added to Broilers Diets - Workshop BEAM - Bread and Meat for the Future. Mensagem recebida por <caroline.ceribeli@usp.br> em 17 set. 2015.

Dieta Inicial – de 8 a 21 dias de idade

Ingredients	VIT. E mg/kg	YERBA MATE mg/kg				
	250	0	250	500	750	1,000
Corn	61.93	61.93	61.93	61.93	61.93	61.93
Soybean meal 45%	33.16	33.16	33.16	33.16	33.16	33.16
Soybean oil	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
Dicalcium Phosphate	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66
Limestone	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
Salt	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
DL-Methionine 99%	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
L-Lysine HCL 78%	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Inert	0.75	1.00	0.75	0.50	0.25	0.00
Vitamin+Mineral Supplement	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline Chloride 60%	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
L-Threonine 98,5%	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Anticoccidial	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Vitamin E	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Yerba Mate	0.00	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00
Calculated levels						
MEn, Kcal/kg	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
CP, %	20.77	20.77	20.77	20.77	20.77	20.77

Fonte: RACANICCI, A. M. C., 2015 (slides)⁶. Com permissão de Aline Mondini Calil Racanicci.

⁶ RACANICCI, A. M. C. Animal Performance and Metabolism, Meat Quality, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Added to Broilers Diets - Workshop BEAM - Bread and Meat for the Future. Mensagem recebida por <caroline.ceribeli@usp.br> em 17 set. 2015.

Dieta de Crescimento – de 22 a 33 dias de idade

Ingredients	VIT. E mg/kg	YERBA MATE mg/kg				
	250	0	250	500	750	1,000
Corn	65.31	65.31	65.31	65.31	65.31	65.31
Soybean meal 45%	27.31	27.31	27.31	27.31	27.31	27.31
Soybean oil	1.94	1.94	1.94	1.94	1.94	1.94
Dicalcium Phosphate	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53
Limestone	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Salt	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39
DL-Methionine 99%	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
L-Lysine HCL 78%	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Inert	0.75	1.00	0.75	0.50	0.25	0.00
Vitamin+Mineral Supplement	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84
Choline Chloride 60%	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
L-Threonine 98,5%	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
Anticoccidial	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
Vitamin E	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Yerba Mate	0.00	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00
Calculated levels						
MEn, Kcal/kg	3.100	3,100	3,100	3,100	3,100	3,100
CP, %	18,88	18.88	18.88	18.88	18.88	18.88

Fonte: RACANICCI, A. M. C., 2015 (slides)⁷. Com Permissão de: Aline Mondini Calil Racanicci.

⁷ RACANICCI, A. M. C. Animal Performance and Metabolism, Meat Quality, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Added to Broilers Diets - Workshop BEAM - Bread and Meat for the Future. Mensagem recebida por <caroline.ceribeli@usp.br> em 17 set. 2015.

Dieta de Acabamento – de 34 a 38 dias de idade

Ingredients	VIT. E mg/kg	YERBA MATE mg/kg				
	250	0	250	500	750	1.000
Corn	71.48	71.48	71.48	71.48	71.48	71.48
Soybean meal 45%	23.05	23.05	23.05	23.05	23.05	23.05
Soybean oil	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
Dicalcium Phosphate	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31
Limestone	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69
Salt	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36
DL-Methionine 99%	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
L-Lysine HCL 78%	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
Inert	0.75	1.00	0.75	0.50	0.25	0.00
Vitamin+Mineral Supplement	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
Choline Chloride 60%	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Vitamin E	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Yerba Mate	0.00	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00
Calculated levels						
MEn, Kcal/kg	3,200	3,200	3,200	3,200	3,200	3,200
CP, %	16.86	16.86	16.86	16.86	16.86	16.86

Fonte: RACANICCI, A. M. C., 2015 (slides)⁸. Com permissão de Aline Mondini Calil Racanicci.

⁸ RACANICCI, A. M. C. Animal Performance and Metabolism, Meat Quality, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Added to Broilers Diets - Workshop BEAM - Bread and Meat for the Future. Mensagem recebida por <caroline.ceribeli@usp.br> em 17 set. 2015.