

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados
ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da
dieta. I. Estabilidade oxidativa**

María Elena de los Dolores Bernal Gómez

Tese para obtenção de grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof.Dr. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2003

María Elena de los Dolores Bernal Gómez

**Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados
ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da
dieta. I. Estabilidade oxidativa**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Jorge Mancini Filho
Orientador/Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, _____ de _____.

***“De nada nos valerá o conhecimento de todas as ciências do mundo,
de tudo o que está fora de nós,
se não conhecermos a nós mesmos”***

A meus amados pais,
Salomón e Laura,
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Jorge Mancini Filho (meu orientador) pela amizade, confiança, estímulo e ajuda sempre demonstrada.

Aos demais professores membros da banca examinadora pela colaboração muito valiosa.

Ao Prof. Cássio e ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pela grande colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo outorgada.

Às meninas do Instituto Adolfo Lutz, Jussara e Dola, pela ajuda e colaboração na realização da análise sensorial e Miriam pela colaboração nas análises cromatográficas.

A Adriana e Leila (bibliotecárias) pela revisão das referências bibliográficas.

Às secretárias do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Mônica, Catarina, Tânia, Isabel e aos secretários da Pós-graduação, Benedita, Elaine e Jorge, pela atenção e colaboração sempre demonstrada.

Meu eterno agradecimento a minha querida e sempre lembrada família: Salomón e Laura (pais), Leticia (irmã), Gabriel, Patricio, Gonzalo, Efraín, Gustavo, Fabián (irmãos), Alfonso (cunhado), Alicia, Susy O. Lupe, Susy D., Elzie, Mónica (cunhadas), Gabi, Andrés, Petisa, Alfonso Jr., Elisa, Pato, Belén, Anita, Carol, Dany, Pauli, Pitinho, Andreíta, David e o caçulinha Nikito (sobrinas e sobrinos), pelas orações, pelo amor, apoio e incentivo de todos os dias.

À Rosângela (Rô), a responsável pelo Laboratório de Lípidos e minha amiga muito querida, pela compreensão, pelo estímulo sempre demonstrado, atenção cordial, colaboração, pela ajuda incondicional desde o dia em que cheguei.

À Fabiana (Lab. de Nutrição), pela conquista de uma sincera amizade e a sua companhia muito agradável.

À minha amiga Fernandinha, estagiária do Laboratório de Lípidos e futura pós-graduanda, pela companhia agradável e ajuda sempre demonstrada.

A meus amigos Dorita e Victor (peruanos), pela ajuda muito grande, pela companhia e amizade de todos os dias.

À minha querida amiga Alexandra, por estar sempre a meu lado, mesmo à distância.

À minha querida amiga Shirley (do Rio de Janeiro), pela amizade de sempre.

À minha querida amiga Tetê e sua filha Priscila, por todo esse tempo compartilhado, tempo de muito carinho e amizade.

Às minhas amigas e colegas do Laboratório de Lípidos: Elaine, Nara, Céphora, Ana Vlândia, Lourdes, pelo companheirismo, pela contribuição com seus conhecimentos, pelos conselhos e muita ajuda.

Às minhas amigonas, Rose e Fátima (secretárias do diretor), pelo carinho, colaboração e ajuda.

À Denise e ao Chiu (Bloco 16) pela amizade incondicional.

Às funcionárias e minhas amigas, Lourdinha, Joaquina e Márcia, pela convivência muito agradável, pelo carinho e colaboração.

Às famílias Pazmiño, Betancourt, Pereira e Spezzacatena, pela amizade, carinho e constante estímulo.

Aos amigos Lúcia, Alberto, Ana, Neuza (do segundo andar), pelo bom relacionamento.

A meu ex-orientador e amigo José Luis Ascheri, pelo incentivo sempre demonstrado.

A meu amigo Isaías (Embrapa do Rio de Janeiro) pelo carinho e incentivo.

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

De uma maneira especial a Deus, pela força, pelo ânimo, pela fé...por tudo.

Obrigada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 LÍPIDES	3
2.1.1 Funções	3
2.1.2 Estrutura química e classificação	4
2.1.3 Ácidos graxos essenciais	7
2.1.4 Recomendações do consumo de ômega 6 e ômega 3	9
2.1.5 Papel dos ácidos graxos poliinsaturados na saúde	10
2.2 FONTE DE PUFA (ω-3) SEMENTE DE LINHAÇA (<i>Linun usitatissimum</i> L.)	13
2.2.1 Aspectos gerais	13
2.2.2 Atividade antioxidante da linhaça	14
2.2.3 Aspectos nutricionais	15
2.3 OXIDAÇÃO LIPÍDICA	16
2.4 ANTIOXIDANTES	20
2.4.1 Mecanismos antioxidantes	20
2.4.2 Antioxidantes sintéticos	21
2.4.3 Antioxidantes naturais	23
2.4.4 Especiarias como fonte de antioxidantes naturais	25
2.5 ALIMENTOS FUNCIONAIS	28
2.5.1 Alimentos enriquecidos com ômega 3	28
2.5.2 Ovos enriquecidos com ômega 3	29
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 MATERIAL	35
4.1.1 Matéria-prima	35

4.2 MÉTODOS	35
4.2.1 Preparação das farinhas de linhaça e de especiarias	35
4.2.2 Preparação dos extratos da linhaça e das especiarias	36
4.2.3 Determinação da composição centesimal da linhaça	37
4.2.4 Determinação do teor de matéria seca dos extratos de linhaça e de especiarias	37
4.2.5 Determinação da atividade antioxidante dos extratos de linhaça e de especiarias	37
4.2.6 Determinação dos compostos fenólicos na linhaça e nas especiarias	38
4.2.7 Estudo de estabilidade da linhaça	40
4.2.7.1 Determinação do perfil de ácidos graxos	40
4.2.7.2 Determinação do grau de oxidação	41
4.2.8 Ensaio biológico	43
4.2.8.1 Preparação das rações	43
4.2.8.1.1 Determinação da composição centesimal das rações	44
4.2.8.1.2 Determinação do teor de matéria seca dos extratos das rações	44
4.2.8.1.3 Determinação da atividade antioxidante dos extratos das rações	45
4.2.8.2 Experimento	45
4.2.8.3 Amostragem	45
4.2.9 Determinação do perfil dos ácidos graxos nas gemas de ovo	46
4.2.10 Determinação do grau de oxidação das gemas de ovo	47
4.2.11 Estudo de estabilidade das gemas de ovo	49
4.2.11.1 Determinação do perfil de ácidos graxos	49
4.2.11.2 Determinação do grau de oxidação	49
4.2.12 Determinação do perfil de ácidos graxos nos tecidos das aves	49
4.2.13 Determinação do grau de oxidação nos tecidos das aves	50
4.2.13.1 Quantificação de MDA nos tecidos das aves	50
4.2.13.2 Quantificação de proteína nos tecidos das aves	52
4.2.13.3 Cálculo da concentração de malonaldeído (MDA) relacionada com a quantidade de proteína	53
4.2.14 Análise sensorial das gemas de ovo	53
4.2.14.1 Avaliação sensorial dos atributos aparência, odor e sabor	53

4.2.14.2 Avaliação da intensidade da cor amarela das gemas de ovos	54
4.2.14.3. Avaliação instrumental da cor das gemas de ovos	54
4.2.15 Análise estatística	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA LINHAÇA	57
5.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE DA LINHAÇA	58
5.2.1 Determinação do perfil de ácidos graxos	58
5.2.2 Determinação do grau de oxidação da semente de linhaça	59
5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NOS EXTRATOS DE LINHAÇA	61
5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NOS EXTRATOS DAS ESPECIARIAS	63
5.5 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NA LINHAÇA E NAS ESPECIARIAS	66
5.5.1 Ácidos fenólicos na linhaça	67
5.5.2 Compostos fenólicos nas especiarias	68
5.6 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DAS RAÇÕES	72
5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS RAÇÕES	73
5.8 ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA 3 NAS GEMAS DE OVO	75
5.8.1 Incorporação do ácido α -linolênico (LNA)	75
5.8.2 Incorporação do ácido docosahexaenóico (DHA)	78
5.9 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO NAS GEMAS DE OVO	81
5.10 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS GEMAS DE OVO	85
5.10.1 Ácidos graxos ômega 3	85
5.10.1.1 Ácido α -linolênico (LNA, C18:3)	85
5.10.1.2 Ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6)	88
5.10.2 Determinação do grau de oxidação	90
5.11 ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA 3 NOS TECIDOS DAS AVES ALIMENTADAS COM LINHAÇA	94
5.11.1 Ácido α -linolênico (LNA, C18:3)	94

5.11.2	Ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6)	97
5.11.3	Ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5)	99
5.12	DETERMINAÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO NOS TECIDOS DAS AVES ALIMENTADAS COM LINHAÇA	102
5.13	ANÁLISE SENSORIAL DAS GEMAS DE OVOS	106
5.13.1	Avaliação sensorial dos atributos aparência, odor e sabor	106
5.13.2	Avaliação da intensidade da cor amarela das gemas de ovos	109
5.13.3	Avaliação instrumental da cor das gemas de ovos	110
6.	CONCLUSÕES	114
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Nomes dos principais ácidos graxos	5
Tabela 2	Recomendações do consumo de ácidos graxos ômega 6 e ômega 3 para adultos, bem como as quantidades adequadas destes ácidos numa fórmula/dieta infantil	10
Tabela 3	Mistura de padrões de ácidos fenólicos	39
Tabela 4	Curva padrão do TEP 1×10^{-5} M	41
Tabela 5	Formulações das rações em porcentagem	43
Tabela 6	Curva padrão do TMP 6×10^{-6} M	52
Tabela 7	Curva padrão de albumina	53
Tabela 8	Perfil de ácidos graxos na linhaça	59
Tabela 9	Valores de TBA da linhaça, expressos como mg de malonaldeído / Kg de amostra	60
Tabela 10	Porcentagem de inibição da oxidação dos extratos da linhaça	61
Tabela 11	Concentração dos extratos alcoólico e aquoso da linhaça, responsável pela atividade antioxidante em 50 μ L de extrato	61
Tabela 12	Porcentagem de inibição da oxidação dos extratos alcoólico e aquoso do orégano e do alecrim	63
Tabela 13	Concentração dos extratos alcoólico e aquoso do orégano e do alecrim, responsável pela atividade antioxidante em 50 μ L de extrato	64
Tabela 14	Ácidos fenólicos nas diferentes frações do orégano e do alecrim	69
Tabela 15	Composição centesimal das rações (g / 100 g de amostra)	72
Tabela 16	Perfil de ácidos graxos da fração lipídica das rações (% de área)	73
Tabela 17	Porcentagem de inibição da oxidação nas rações (8 tratamentos)	74
Tabela 18	Incorporação do ácido α -linolênico (LNA) nas gemas de ovo, em 4 períodos de tempo, expresso como mg de ácido / g de gema	76

Tabela 19	Incorporação do ácido docosahexaenóico (DHA) nas gemas de ovo, em 4 períodos de tempo, expresso como mg de ácido / g de gema	79
Tabela 20	Teste de TBA nas gemas de ovo, (valores médios de absorbância dos tratamentos com 0 e 5% de óleo de linhaça com seu respectivo controle, sem antioxidante, nos 4 períodos de tempo)	82
Tabela 21	Determinação do ácido α -linolênico (LNA, C18:3) nas gemas de ovo, expresso como mg de ácido / g de gema	86
Tabela 22	Determinação do ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6) nas gemas de ovo, expresso como mg de ácido / g de gema	88
Tabela 23	Valores de absorbância na determinação do grau de oxidação nas gemas de ovo	91
Tabela 24	Incorporação do ácido α -linolênico (LNA, C18:3) nos tecidos das aves, valores expressos como média (% de área) \pm desvio padrão	96
Tabela 25	Incorporação do ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6) nos tecidos das aves, valores expressos como média (% de área) \pm desvio padrão	98
Tabela 26	Incorporação do ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5) no fígado das aves, valores expressos como média (% de área) \pm desvio padrão	99
Tabela 27	Índice de insaturação (*) dos tecidos, valores expressos como média \pm desvio padrão	101
Tabela 28	Peroxidação lipídica dos tecidos das aves, valores expressos como média \pm desvio padrão (μ mol de MDA/mg de proteína)	105
Tabela 29	Avaliação sensorial dos atributos de aparência, odor e sabor das gemas de ovos dos tratamentos.	108
Tabela 30	Atuação dos antioxidantes naturais e sintéticos nos atributos aparência, odor e sabor das gemas de ovos	109
Tabela 31	Avaliação da cor amarela em escala não estruturada, dos tratamentos	110
Tabela 32	Avaliação instrumental da cor das gemas inteiras de ovos dos tratamentos	111
Tabela 33	Avaliação instrumental global da cor das gemas inteiras de ovos dos tratamentos	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Competição metabólica entre as séries ω -6 e ω -3	8
Figura 2	Estrutura química do ácido nordihidroguaiaretico (NDGA) e do secoisolariciresinol diglucosídeo	15
Figura 3	Peroxidação lipídica	19
Figura 4	Estrutura química dos principais antioxidantes sintéticos	22
Figura 5	Proteção contra o dano oxidativo da membrana, mediada pela dieta	25
Figura 6	Estrutura química dos compostos antioxidantes no alecrim	27
Figura 7	Estrutura química do glicosídeo fenólico antioxidante no orégano	27
Figura 8	Obtenção dos extratos alcoólico e aquoso das farinhas de linhaça e das especiarias	36
Figura 9	Teste do TBA, utilizado nas amostras de linhaça	42
Figura 10	Teste do TBA, utilizado nas gemas de ovos	48
Figura 11	Teste do TBA, utilizado nos tecidos das aves	51
Figura 12	Análise sensorial da aparência, odor e sabor das gemas de ovo	55
Figura 13	Avaliação da intensidade da cor amarela das gemas de ovo	55
Figura 14	Análise instrumental da cor das gemas de ovo	56
Figura 15	Composição centesimal da semente de linhaça	57
Figura 16	Atividade antioxidante da fração alcoólica da linhaça	62
Figura 17	Atividade antioxidante da fração aquosa da linhaça	62
Figura 18	Atividade antioxidante da fração alcoólica do orégano	64
Figura 19	Atividade antioxidante da fração alcoólica do alecrim	65

Figura 20	Atividade antioxidante da fração aquosa do orégano	65
Figura 21	Atividade antioxidante da fração aquosa do alecrim	65
Figura 22	Ácidos fenólicos na fração AFES da linhaça (1, salicílico; 2, p-hidroxibenzóico; 3, vanílico; 4, gentísico; 5, gálico; 6, ferúlico; 7, clorogênico)	68
Figura 23	Ácidos fenólicos na fração solúvel (AFES) do orégano (1, p-hidroxibenzóico; 2, protocatequínico; 3, quínico; 4, (-)quínico; 5, caféico; 6, clorogênico)	70
Figura 24	Ácidos fenólicos na fração solúvel (AFES) do alecrim (1, p-hidroxibenzóico; 2, vanílico; 3, p-cumárico; 4, ferúlico; 5, caféico)	70
Figura 25	Incorporação de LNA nas gemas de ovo nos tratamentos com 0 e 5% de óleo de linhaça	77
Figura 26	Incorporação de DHA nas gemas de ovo nos tratamentos com 0 e 5% de óleo de linhaça	80
Figura 27	Teste de TBA nas gemas de ovo, (valores de absorbância vs. tempo) dos tratamentos com 0% de óleo de linhaça e seu respectivo controle	83
Figura 28	Teste de TBA nas gemas de ovo, (valores de absorbância vs. tempo) dos tratamentos com 5% de óleo de linhaça e seu respectivo controle	83
Figura 29	Correlação da avaliação sensorial e instrumental da cor das gemas de ovos	113

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1** Teste de Diferença do Controle ou Comparação Múltipla
- Anexo 2** Escala não estruturada para avaliação da cor amarela
- Anexo 3** Espectros de massa dos ácidos fenólicos na fração solúvel do orégano (1, protocatequínico; 2, quínico; 3, - quínico; 4, caféico; 5, clorogênico)
- Anexo 4** Espectros de massa dos ácidos fenólicos na fração solúvel do alecrim (1, vanílico; 2, p-cumárico; 3, ferúlico; 4, caféico)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de dietas suplementadas com semente de linhaça (ricas em ácido α -linolênico, LNA, ω 3) e antioxidantes naturais, provenientes do orégano e do alecrim, sobre o nível de incorporação dos ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (PUFA ω 3) em ovos e tecidos de aves. Para isto, 192 galinhas poedeiras da linhagem comercial Babcock de 22 semanas, foram alimentadas durante 30 dias com dietas constituídas de 0 (zero) e 5% de óleo de linhaça. Foram definidos 8 tratamentos: 4 grupos com 5% de óleo de linhaça (controle/sem antioxidante; BHA+BHT, 100+100 ppm; orégano, 200 ppm; alecrim, 200 ppm) e 4 grupos sem óleo de linhaça, mas utilizando os mesmos antioxidantes. A amostragem dos ovos foi realizada durante o experimento nos períodos 0, 10, 20 e 30 dias e dos tecidos das aves (sobrecoxa, coxa, asa, peito, coração, tecido adiposo e fígado) no tempo final do experimento. Os ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa e o grau de oxidação lipídica através do teste do ácido tiobarbitúrico (TBA). De acordo aos resultados obtidos, verificou-se aumento significativo dos ácidos graxos α -linolênico (LNA) e docosahexaenóico (DHA) nas gemas de ovo das aves que receberam 5% de óleo de linhaça nos tratamentos controle, BHA+BHT, orégano e alecrim, nos diferentes tempos (10, 20 e 30 dias), quando comparados com a dieta 0% linhaça. Além disso, a incorporação máxima dos ácidos LNA e DHA nas gemas de ovo foi obtida aos 20 dias de alimentação das aves, com um índice de incorporação de 15 a 30 e de 2,5 a 4,5 vezes o grupo controle, respectivamente. Na avaliação do grau de oxidação lipídica nas gemas de ovo, foi verificada diferença significativa na redução dos valores de absorvância nas 2 dietas, em todos os tratamentos com antioxidantes, quando relacionados ao seu respectivo controle. Com relação aos tecidos das aves, também houve incorporação significativa dos ácidos LNA e DHA, quando comparadas as duas dietas, sendo o fígado o tecido que apresentou a maior concentração destes ácidos graxos. Também foi possível verificar a eficácia dos antioxidantes naturais na proteção contra a oxidação lipídica nos tecidos sobrecoxa, coxa, asa e peito. Portanto, os

extratos das especiarias, alecrim e orégano, podem ser utilizados satisfatoriamente para se obter ovos e tecidos de aves enriquecidos com PUFA ω -3, melhorando a estabilidade lipídica. Considerando que os PUFA ω -3 têm um interesse considerável na saúde humana, o fornecimento de dietas ricas em ácido α -linolênico presente na linhaça, para galinhas poedeiras, permitiu a obtenção de ovos e tecidos enriquecidos, os quais tornam-se uma fonte alternativa de PUFA ω -3.

SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the influence of diets containing flaxseed (rich in α -linolenic acid, LNA, ω -3) and natural antioxidants from oregano and rosemary on the level of incorporation of the polyunsaturated fatty acids omega 3 (PUFA ω -3) in eggs and tissues of poultry. For this purpose, 192 laying hens at 22 weeks of age, of commercial lineage Babcock, were fed for 30 days with diets containing 0 (zero) or 5% of flaxseed oil. The hens were divided in 8 groups: 4 groups received diets with 5% of flaxseed oil (control / no antioxidant; BHA+BHT, 100+100 ppm; oregano, 200 ppm; rosemary, 200 ppm) and 4 groups received no flaxseed oil, but the same antioxidants. The sampling of the eggs was accomplished in 4 periods (0, 10, 20 and 30 days) and of the tissues of poultry (upper thigh, thigh, wing, breast, heart, adipose tissue and liver) at the end of experiment. The fatty acids were analysed by gas chromatography and the lipid oxidation was determined by thiobarbituric acid test (TBA). The results showed that the levels of α -linolenic (LNA) and docosahexaenoic (DHA) acids increased in egg yolks from hens of the 4 groups fed diets with 5% flaxseed oil after 10, 20 and 30 days, when compared with diets 0% flaxseed oil. In addition, the maximum incorporation of LNA and DHA in egg yolks was obtained after 20 days, with an index of incorporation ranging from 15 to 30 and from 2.5 to 4.5, respectively. Also, a significant decrease of lipid oxidation in egg yolks for all groups receiving antioxidants was observed, when related with control. In the tissues of the hens, there was also significant incorporation of the LNA and DHA acids, when comparing the 2 diets, with the liver presenting the major concentration of these fatty acids. It was also possible to verify the effectiveness of the natural antioxidants in the protection against lipid oxidation in upper thigh, thigh, wing and breast tissues. Therefore, rosemary and oregano can be used satisfactorily to obtain eggs and tissues of poultry enriched with PUFA ω -3, improving the lipid stability. Considering that the PUFA ω -3 have considerable interest in the human health, the administration of diets rich in α -linolenic acid from flaxseed to laying hens allows the eggs and tissues enrichment as an alternative source of PUFA ω -3.

1. INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, existe um interesse considerável nos ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (PUFA ω -3) na saúde humana. Os ácidos graxos poliinsaturados da série ω -3, bem como os da série ω -6 são conhecidos como essenciais na dieta dos humanos. O ácido α -linolênico (α -LNA, 18:3, ω -3) pode ser metabolicamente convertido nos ácidos docosahexaenóico (DHA, 22:6, ω -3) e eicosapentaenóico (EPA, 20:5, ω -3); não obstante, as enzimas envolvidas nesta conversão são comuns na via da alongação e dessaturação do ácido linoléico e a competição com os ácidos graxos ω -6 reduziria a quantidade de α -LNA convertido (CHAN, *et al.*, 1993). Portanto, é recomendada a redução dos ω -6 quando os ω -3 são aumentados na dieta de adultos e recém-nascidos, para um metabolismo cardiovascular e um funcionamento cerebral adequados (SIMOPOULOS, *et al.*, 1999).

Uma das principais fontes na dieta de PUFA ω -3 de cadeia longa é o pescado, rico nos ácidos graxos EPA e DHA. Os óleos das sementes oleaginosas, particularmente o óleo de linhaça é rico em ácido α -linolênico, precursor destes ácidos graxos (CALDER, 1998).

O enriquecimento das rações de galinhas poedeiras com óleos marinhos, algas ou sementes oleaginosas como a linhaça, promove facilmente a incorporação de ω -3 na gema de ovos (VAN ELSWYK, 1997). O interesse no consumo de linhaça está relacionado além do seu alto conteúdo de ácido α -linolênico (50-55%), a presença de fibra dietética, lignanos e compostos fenólicos, os quais são provavelmente benéficos na redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares e câncer (CHEN, *et al.*, 1994).

O ovo é um alimento amplamente conhecido, que contém proteínas de alta qualidade e de baixo custo, que pode ser produzido facilmente sob muitas condições de manuseio doméstico ou industrial, apresentando possibilidades culinárias fáceis e variadas. De forma geral, o consumo anual de ovos *per capita* no Brasil é de 93, bem menos do que no Japão e em Taiwan que são os maiores consumidores com 346 e 342 ovos por ano, respectivamente (Associação Paulista de Avicultura, 2002).

Nos últimos tempos, ovos enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), particularmente os ômega 3, têm sido de interesse tanto de pesquisadores como do setor das indústrias de alimentos, por serem estes ácidos essenciais para o desenvolvimento e crescimento normal do organismo e possuir um papel importante na prevenção e estarem associados ao tratamento de doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes, artrite, problemas inflamatórios, autoimunes e câncer (SIMOPOULOS, 2000).

Devido ao fato dos PUFA serem particularmente propensos à oxidação ou ao ataque de radicais livres (PAPAS, 1999), com o aumento destes ácidos nas dietas das aves, há um aumento concomitante na suscetibilidade à deterioração oxidativa dos ovos, levando à perda nas características tanto da qualidade como do valor nutricional, menor aceitação do consumidor e efeitos biológicos adversos. Esta suscetibilidade à oxidação depende também de fatores como a concentração de pró-oxidantes e de antioxidantes (LOPEZ-BOTE *et. al.*, 1998).

Muitos antioxidantes sintéticos como o BHA, BHT, PG e TBHQ, apresentam efetividade na redução da oxidação lipídica em nível de 200 ppm. Antioxidantes naturais extraídos de plantas, podem ser usados como alternativas aos antioxidantes sintéticos, devido a seu efeito equivalente ou maior na inibição da oxidação lipídica (NAMIKI, 1990). MADSEN e BERTELSEN (1995), indicam algumas especiarias, como alecrim, salvia e orégano, apresentando atividade antioxidante efetiva.

Considerando estes aspectos, esta pesquisa teve como objetivo a incorporação do LNA ω -3 em ovos de galinhas poedeiras através da dieta suplementada com linhaça e antioxidantes naturais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LÍPIDES

O termo lípide é usado normalmente para indicar, de uma forma pouco exata, uma ampla variedade de produtos orgânicos que possuem a característica comum de não serem solúveis em água e sim em solventes apolares (hexano, éter, clorofórmio, etc). Junto com as proteínas e os carboidratos, os lípides são um dos mais importantes nutrientes, que fornecem ao corpo a energia e mantêm outros processos celulares vitais. Os principais lípides incluem triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos, colesterol, ésteres do colesterol e fosfolípidos (SALEM, 1999). Outros lípides, embora presentes em quantidades relativamente pequenas, participam de papéis importantes como cofatores enzimáticos, carregadores de elétrons, pigmentos, agentes emulsificantes, hormônios e mensageiros intracelulares (LEHNINGER, et al., 1993).

2.1.1 Funções

Os lípides possuem um número grande de funções, entre elas:

Energética: os lípides provêm uma energia de 9 calorias por grama, são armazenados pelo corpo, principalmente como triglicerídeos, até sua utilização.

Estrutural: os lípides são um dos principais componentes das membranas celulares e são vitais para manter a integridade celular, forma, flexibilidade e permeabilidade.

Processos fisiológicos: os lípides da dieta são decisivos para o funcionamento de cada órgão e tecido, por estarem diretamente envolvidos na produção de eicosanóides (substâncias parecidas aos hormônios, que regulam muitos sistemas do organismo). Participam na manutenção da parede vascular e nas respostas imunes.

Absorção de vitaminas: os lípides atuam como transportadores de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), ajudando na sua absorção.

Palatabilidade: proporcionam aos alimentos sabor, odor e textura, além de darem a sensação de saciedade (SALEM, 1999).

2.1.2 Estrutura química e classificação

Quimicamente, os lípides são misturas de glicerídeos que, por sua vez, são estruturas formadas pela associação química entre o glicerol e uma, duas ou três moléculas de ácidos graxos. A maior parte dos lípides contém uma ou mais moléculas de ácidos graxos como parte da sua estrutura química básica. Os ácidos graxos estão formados de uma cadeia hidrocarbonada, variando no comprimento, de 2 a 20 ou mais átomos de carbono, com um grupo carboxílico (HO-C=O) a um extremo da cadeia e um grupo metílico (CH₃) no outro. Os ácidos graxos mais comuns nos alimentos consistem em um número par de átomos de carbono, variando de 12 a 22 carbonos, se bem que, ácidos graxos mais curtos, mais compridos ou com um número ímpar de carbonos têm sido identificados em alimentos preparados (SALEM, 1999).

Os ácidos graxos são, freqüentemente, nomeados em forma abreviada de acordo com suas estruturas químicas e são classificados como saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, dependendo do número de duplas ligações (Tabela 1). Os ácidos graxos saturados se encontram, predominantemente, em alimentos como carne, ovos, queijo, leite e manteiga, óleos de coco e palma, como também em “shortening” vegetais hidrogenados. O ácido oléico é o mais comum dos ácidos graxos monoinsaturados e se encontra na maioria das gorduras animais, incluindo aves, carne de vaca e cordeiro, bem como em azeitonas, sementes e nozes. Já, os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) se classificam, principalmente, nas séries ômega 6 (ω -6) e ômega 3 (ω -3), os mesmos que se diferenciam na posição da primeira dupla ligação, contando desde o grupo metílico terminal da cadeia do ácido graxo. O ácido linoléico é o expoente mais importante da série (ω -6) e está presente de forma abundante nos óleos vegetais como óleo de girassol, cártamo, milho, soja, algodão, etc. O ácido α -linolênico, representante da família ω -3, é encontrado em quantidades apreciáveis em sementes oleaginosas como canola, soja e linhaça (DZIEZAK,

1989). Contudo, tanto nos vegetais (algas, microalgas, fitoplancton), quanto nos animais de origem marinha (peixes, crustáceos), encontram-se outros ácidos graxos com maior número de carbonos e com maior quantidade de duplas ligações, que também pertencem à série ômega 3. São os chamados ácidos graxos de cadeia muito longa (superior a 18 carbonos) LCPUFA (do inglês “long chain polyunsaturated fatty acids”), eles são o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5, ω -3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6, ω -3). Muitas plantas marinhas, especialmente algas unicelulares no fitoplancton, também realizam a alongação da cadeia e adicional dessaturação do ácido α -linolênico para produzir os ácidos EPA e DHA. A formação desses LCPUFA ω -3 pelas algas marinhas e sua transferência através da cadeia alimentar aos peixes explica a abundância deles em alguns óleos de peixe de origem marinha (CALDER, 1998).

Tabela 1. Nomes dos principais ácidos graxos

NOME COMUM	CÓDIGO	NOMENCLATURA
Ácidos graxos saturados de cadeia curta		
Butírico	C4:0	Butanóico
Ácidos graxos saturados de cadeia média		
Capróico	C6:0	Hexanóico
Caprílico	C8:0	Octanóico
Cáprico	C10:0	Decanóico
Láurico	C12:0	Dodecanóico

Tabela 1. (Cont.)

Ácidos graxos de cadeia longa		
Mirístico	C14:0	Tetradecanóico
Palmítico	C16:0	Hexadecanóico
Esteárico	C18:0	Octadecanóico
Palmitoléico	C16:1, n-7 cis	9-hexadecaenóico
Oléico	C18:1, n-9 cis	9-octadecaenóico
Elaídico	C18:1, n-9 trans	9-octadecaenóico
Linoléico	C18:2, n-6,9 cis	9,12-octadecadienóico
α -linolênico	C18:3, n-3,6,9 cis	9,12,15-octadecatrienóico
γ -linolênico	C18:3, n-6,9,12 cis	6,9,12-octadecatrienóico
Columbínico	C18:3, n-6 cis, 9 cis, 13 trans	5,9,12-octadecatrienóico
Ácidos graxos de cadeia muito longa		
Araquídico	C20:0	Eicosanóico
Behênico	C22:0	Docosanóico
Eicosenóico	C20:1, n-9 cis	11-eicosenóico
Erúcico	C22:1, n-9 cis	13-docosaenóico
Brassídico	C22:1, n-9 trans	13-docosaenóico
Cetoléico	C22:1, n-11 cis	11-docosaenóico
Nervônico	C24:1, n-9 cis	15-tetracosanóico
Dihomo- γ -linolênico	C20:3, n-6,9,12 cis	8,11,14-eicosatrienóico
Araquidônico	C20:4, n-6,9,12,15 cis	5,8,11,14-eicosatetraenóico
Timnodônico	C20:5, n-3,6,9,12,15 cis	5,8,11,14,17-eicosapentaenóico
Clupanodônico	C22:5, n-3,6,9,12,15 cis	7,10,13,16,19-docosapentaenóico
Docosahexaenóico	C22:6, n-3,6,9,12,15,18 cis	4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico

Fonte: LINSCHER e VERGROESEN (1994)

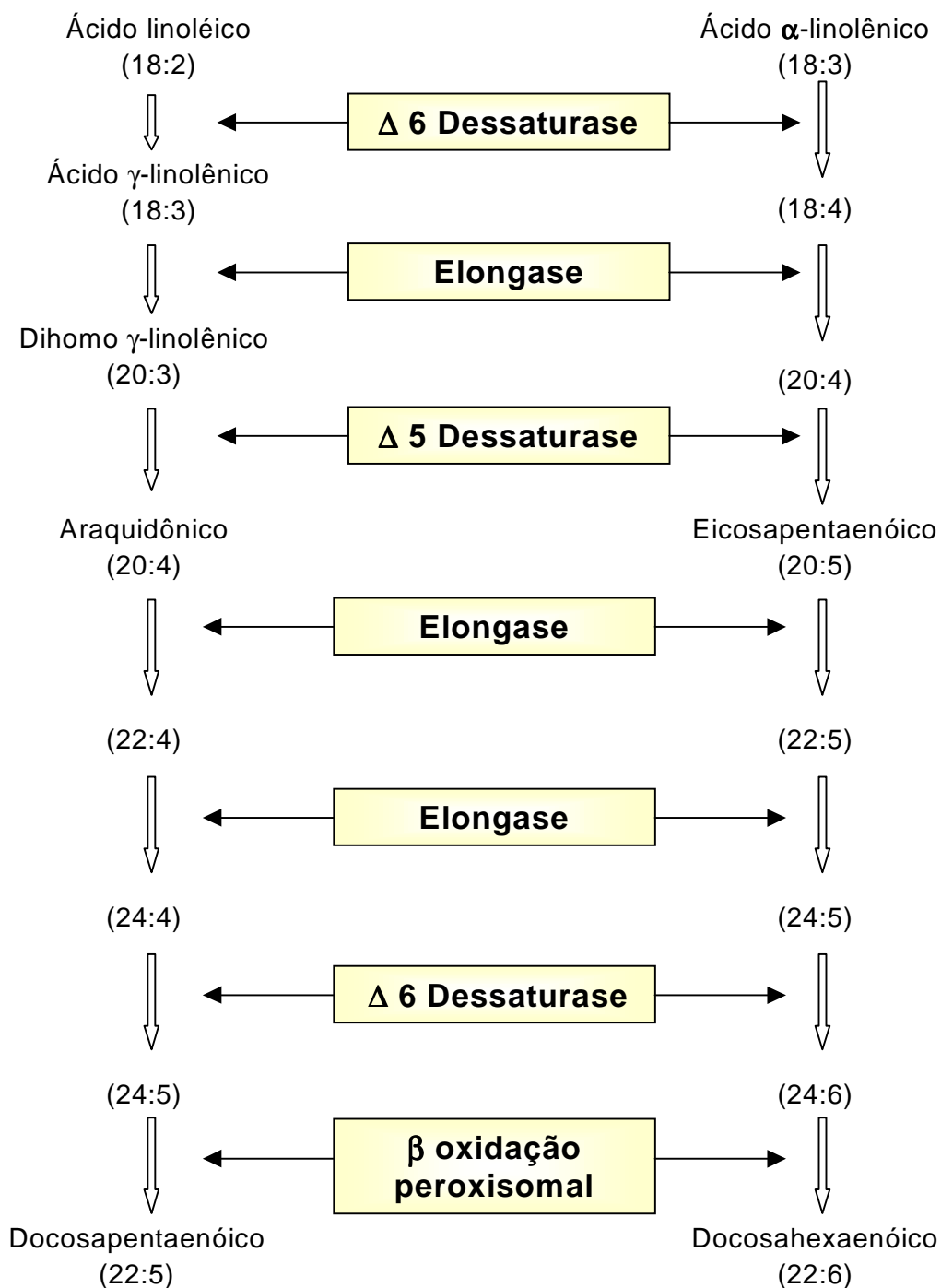
2.1.3 Ácidos graxos essenciais

Os ácidos graxos linoléico e α -linolênico são precursores dos PUFA ω -6 e ω -3 de cadeia mais longa, respectivamente. Estes ácidos não podendo ser biosintetizados em animais, incluindo o homem, e sendo necessários para a saúde, são considerados essenciais EFA (do inglês “essential fatty acids”) (HORNSTRA, 2001). No entanto, uma vez consumidos, os ácidos linoléico e α -linolênico podem ser alongados até cadeias de pelo menos 20 ou 22 carbonos. O ácido linoléico pode ser metabolizado em outros ácidos ω -6, incluindo os ácidos γ -linolênico, dihomo- γ -linolênico e araquidônico. O ácido α -linolênico é metabolizado em outros da série ω -3, entre eles EPA e DHA. Este processo metabólico é mediado pelas enzimas chamadas elongases e dessaturases, as quais participam na formação dos PUFA, ω -6 e ω -3, resultando em uma competição metabólica entre os dois grupos (SALEM, 1999), (Figura 1).

Um excesso de ácido linoléico vai impedir a transformação do α -linolênico em seus derivados EPA e DHA, o mesmo acontecerá no caso contrário, com um menor consumo do ácido linoléico haverá uma diminuição da formação do ácido araquidônico. A concorrência entre os ácidos linoléico e α -linolênico está determinada pela afinidade da enzima delta 6 dessaturase por ambos ácidos graxos. Como a enzima tem maior especificidade pelos ácidos graxos ômega 3, precisará de menores quantidades destes ácidos que dos ômega 6 para produzir a mesma quantidade de produto (MADSEM *et al.*, 1999). Isto significa que deve existir uma proporção maior de ácido linoléico que de α -linolênico. Portanto, é necessário um equilíbrio entre o aporte dos dois ácidos graxos através da dieta.

ÔMEGA 6

ÔMEGA 3



Fonte: SALEM (1999)

Figura 1. Competição metabólica entre as séries ω -6 e ω -3

2.1.4 Recomendações do consumo de ômega 6 e ômega 3

Considerando que os ácidos graxos da série ômega 6 e ômega 3 podem influenciar uma variedade ampla de funções biológicas, devido a associação dos mesmos na incorporação ou formação de parte das membranas celulares e serem essenciais para o crescimento e funcionamento do organismo humano, é necessário determinar as recomendações nutricionais relativas ao consumo destes ácidos graxos na dieta. Portanto, tem sido muito discutido por importantes grupos de estudo sobre o consumo diário necessário destes ácidos graxos. Assim, no informe recente de um Comitê Internacional de Especialistas realizado em Maryland (1999), SIMOPOULOS *et al.* (1999), destacam uma recomendação na importância de reduzir os PUFA ω -6, ainda que os PUFA ω -3 sejam aumentados na dieta de adultos e recém-nascidos visando a saúde, funcionamento mental e cardiovascular adequados. Isto é necessário para reduzir os efeitos adversos do excesso do ácido araquidônico e seus produtos eicosanóides. Tal excesso pode ocorrer quando muito ácido linoléico e araquidônico estão presentes na dieta junto com um inadequado fornecimento de ômega 3. Portanto, acrescentando na dieta PUFA ômega 3 e diminuindo certos óleos vegetais com alto conteúdo de linoléico, pode se obter uma melhora na proporção ômega 6/ômega 3 (HARRIS, 1997). Segundo os autores (SIMOPOULOS, *et al.*, 1999), para determinar uma referência da quantidade ingerida na dieta DRI (do inglês "Dietary Reference Intakes"), não se tem dados suficientes, mas, sim para fazer recomendações da ingestão adequada AI (do inglês Adequate Intakes). Desta maneira para adultos são recomendadas as seguintes quantidades expressas na Tabela 2, bem como as quantidades adequadas destes ácidos graxos numa fórmula/dieta infantil, baseada em estudos que demonstraram um crescimento e desenvolvimento neural das crianças de uma forma similar as que foram amamentadas.

Tabela 2. Recomendações do consumo de ácidos graxos ômega 6 e ômega 3 para adultos, bem como as quantidades adequadas destes ácidos numa fórmula/dieta infantil

	CA - ADULTOS	CA – FÓRMULA INFANTIL
Ácido graxo	gramas/dia (dieta de 2.000 kcal)	% ácido graxo
Ácido linoléico	4,44 limite superior: 6,67	10,00
Ácido α -linolênico	2,22	1,50
Ácido araquidônico		0,50
DHA + EPA	0,65	
DHA	mínimo: 0,22	0,35
EPA	mínimo: 0,22	Limite superior: <0,10

CA: Consumo adequado

Fonte: SIMOPOULOS, *et al.* (1999)

Por conseguinte, as recomendações estão ao redor de uma proporção de ácidos graxos ômega 6/ômega 3, desde 5:1 até 10:1. Já, na gravidez e lactância, é recomendado garantir uma ingesta de 300 mg/d de DHA.

2.1.5 Papel dos ácidos graxos poliinsaturados na saúde

Os ácidos graxos ω -6 e ω -3 influenciam no metabolismo dos eicosanóides, na expressão genética e na comunicação intercelular. A composição dos PUFA das membranas celulares depende, em grande dimensão, da quantidade ingerida na dieta. Portanto, é necessário considerar as recomendações das quantidades apropriadas para o consumo diário destes ácidos graxos. As duas classes de PUFA devem ser muito bem diferenciadas pois são metabolicamente diferentes e possuem funções fisiológicas opostas, deste modo o equilíbrio nutricional é importante para se conseguir a

homeostase e desenvolvimento normal do organismo. Um balanço da proporção de ω -6/ ω -3 na dieta é essencial no metabolismo do organismo humano, levando a prevenção de doenças cardiovasculares e crônicas degenerativas e também a uma melhor saúde mental (SIMOPOULOS, 2000).

Nos últimos anos, muitos estudos e investigações clínicas têm sido realizadas sobre o metabolismo dos PUFA em geral e sobre os ácidos graxos ω -3 (de fontes marinhas e de plantas), em particular. Atualmente, sabemos que estes apresentam um papel importante e efeito benéfico na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, aterosclerose, trombose, hipertrigliceridemia, hipertensão, diabetes, artrite, outros problemas inflamatórios e autoimunes e câncer (SALEM *et al.*, 1996; UAUY e VALENZUELA, 2000). No entanto a mudança no nível dos PUFA na dieta pode influenciar a produção e função biológica das citocinas, importantes mediadores biológicos cuja produção excessiva contribui ao desenvolvimento de diversas patologias. Além disso, o consumo aumentado destes ácidos graxos poliinsaturados sem uma proteção antioxidante adequada pode levar à peroxidação lipídica *in vivo* e portanto reduzir seus efeitos benéficos, sendo necessário para minimizar esses riscos, a utilização de níveis apropriados de antioxidantes (MEYDANI, 1996).

Estudos clínicos com suplementação de PUFA ω -3, junto com um consumo reduzido de gordura têm sido sugerido para a prevenção de câncer de mama (STOLL, 1998). Há também evidências de que os ácidos graxos da série ω -3, podem inibir o crescimento de células cancerígenas, *in vitro* e em “explants”, visando a proteção contra o câncer de mama em humanos (ROSE *et al.*, 1996).

As dietas com PUFA ω -3 atuam evitando doenças cardíacas através de uma variedade de ações como a prevenção de arritmias, geração de prostanóides e leucotrienos com ações antiinflamatórias, inibição da síntese de citocinas que aumentam a inflamação e promovem a formação de plaquetas (UAUY e VALENZUELA, 2000). Além disso, para HU *et al.* (2001), diversos estudos têm oferecido forte evidência que um aumento no consumo de ácidos graxos ω -3, diminui substancialmente o risco de problemas cardiovasculares.

Neste efeito benéfico, a linhaça, como também outras importantes fontes de ácido α -linolênico (ex. óleos de canola e soja não hidrogenados e nozes) podem ser incorporadas numa dieta saudável (CONNOR, 1999). Adicionalmente, fontes de origem marinha (óleo de peixe), induzem a mudanças de ácidos graxos nos lípides do sangue (triacilgliceróis, lipoproteínas), reduzindo o perfil lipídico aterogênico (LAYNE *et al.*, 1996).

Já, o DHA é essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso. O conteúdo deste ácido no cérebro e na retina é muito mais alto que em outros órgãos e há mecanismos que mantêm esta quantidade alta durante períodos de deficiência. Durante o crescimento do cérebro, há uma grande incorporação deste ácido que parece ter um papel importante no funcionamento da membrana no sistema nervoso central (LAURITZEN *et al.* 2001). Estudos em primatas e humanos recém-nascidos revelam que o DHA é essencial para o desenvolvimento normal da retina e do cérebro, particularmente em crianças prematuras (SIMOPOULOS, 2000; LAURITZEN *et al.* 2001). Tanto em recém-nascidos não prematuros, os quais não precisam tanto DHA na retina e no cérebro, quanto nos prematuros, os dados são um tanto discordantes. Esses autores sugerem que pode dever-se a diferenças no modelo do estudo, principalmente observando a metodologia utilizada na avaliação visual e o tamanho da diferença na quantidade ingerida de PUFA ω -3 entre os grupos experimentais e controles.

Os ácidos graxos são compostos essenciais das membranas das células imunes e são requeridos para o crescimento e manutenção dessas células. Estudos em culturas de células, modelos animais e em humanos têm indicado que a quantidade e tipo de ácidos graxos influenciam no crescimento e atividade de células imunes. Outros fatores, incluindo o tipo de célula, espécie animal, idade, saúde, duração da alimentação, nutriente antioxidante, tipo e concentração de soro, comprimento da cadeia e proporção entre as classes de ácidos graxos, devem ser também considerados (KELLEY e RUDOLPH, 2000).

2.2 FONTE DE PUFA (ω -3)

SEMENTE DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum* L.)

2.2.1 Aspectos gerais

A linhaça é uma das sementes oleaginosas tradicionais com mais história, por causa da utilização de suas fibras em produtos têxteis, mas, também a partir da sua semente se pode obter um óleo com propriedades secantes devido ao alto teor de ácido α -linolênico e as tortas obtidas podem ser utilizadas para balanceamento de ração animal (TURATTI, 2000).

A produção mundial se encontra entre 2.300.000 e 2.500.000 toneladas anuais, sendo o Canadá o principal produtor. Na América do Sul, o maior produtor é a Argentina, com cerca de 80 ton/ano. O Brasil apresenta uma baixa produção, cerca de 21 ton/ano (Aceites & Grasas, 2000).

Atualmente a linhaça é usada em produtos forneados e como componente de misturas de cereais matinais. Estão em desenvolvimento processos que incluem o óleo de linhaça em rações, de forma que os produtos para consumo humano como a carne, ovos, leite, possam estar enriquecidos com ácidos graxos ω -3 (TURATTI, 2000).

O mercado de produtos naturais oferece já o óleo de linhaça prensado a frio, encapsulado. Além disso, existe o uso medicinal da semente de linhaça em distúrbios gástricos, indigestão, úlceras duodenais e atua também como laxante suave. Na área de cosméticos, o óleo de linhaça é empregado em tratamentos dermatológicos (eczema, acne, pele seca), além de ser usado na formulação de sabonetes líquidos (TURATTI, 2000).

O interesse no consumo de linhaça está relacionado ao seu alto conteúdo de ácido α -linolênico (LNA, 18:3 ω -3, 50-55% de ácidos graxos totais), fibra da dieta, lignanos e compostos fenólicos, os quais são provavelmente benéficos na redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares e câncer (CHEN, *et. al.*, 1994).

2.2.2 Atividade antioxidante da linhaça

Os compostos fenólicos são comumente encontrados em plantas comestíveis e não-comestíveis e têm múltiplos efeitos biológicos, incluindo atividade antioxidante. Em sementes oleaginosas, os compostos fenólicos ocorrem como derivados hidroxilados dos ácidos benzóico e cinâmico, cumarinas, flavonóides e lignanos (OOMAH, *et. al.*, 1995). Nas plantas, estes compostos são importantes para o normal desenvolvimento e defesa contra infecção e injúria (KÄHKÖNEN, *et. al.*, 1999).

Extratos etanólicos (95%) de linhaça exibem propriedades antioxidantes quando avaliados no sistema β -caroteno-ácido linoléico (SHUKLA, *et al.*, 1997). Esses autores, através da separação cromatográfica do extrato etanólico da linhaça obtiveram quatro frações nas quais a atividade antioxidante mais elevada foi observada na fração I que contém uma quantidade moderada de compostos fenólicos, já as frações II a IV apresentaram atividade antioxidante mais baixa. Separações adicionais da fração I utilizando cromatografia em camada fina indicaram que lignanos da linhaça estariam envolvidos nesta atividade (AMAROWICZ *et al.*, 1993). Entre os lignanos tem sido identificado o diglucosídeo seicoisolariciresinol, o qual teria uma atividade antioxidante potente devido à sua semelhança na estrutura química com o ácido nordihidroguaiarético (NDGA) conhecido como um antioxidante eficaz (Figura 2).

O conteúdo de ácidos fenólicos na linhaça foi considerado mais baixo que os de outras sementes oleaginosas (WANASUNDARA e SHAHIDI, 1994). Trans-ferúlico foi o ácido fenólico predominante na linhaça e os ácidos trans-sinápico, trans-p-cumárico, trans-cafeico e p-hidroxibenzoico foram encontrados em menores quantidades (DABROWSKI e SOSULSKI, 1984; NACZK e SHAHIDI, 1989). Sabe-se que os tocoferóis possuem uma forte atividade antioxidante, portanto a sua presença na semente de linhaça, especialmente γ -tocoferol determinada por OOMAH *et al.* (1997), estaria colaborando com a atividade antioxidante desta semente.

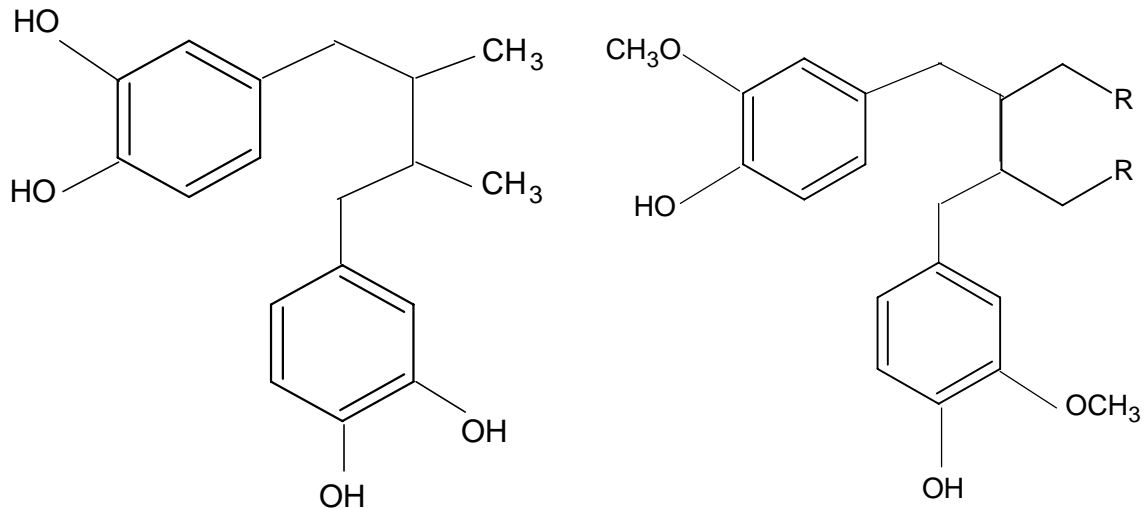


Figura 2. Estrutura química do ácido nordihidroguaiaretico (NDGA) e do secoisolariciresinol diglucosídeo

2.2.3 Aspectos nutricionais

A importância dos constituintes antioxidantes de plantas na manutenção da saúde e na proteção contra doenças cardiovasculares e câncer, tem aumentado o interesse de se ter mais conhecimento sobre os mesmos, entre os pesquisadores, fabricantes de alimentos e consumidores como uma tendência em direção aos alimentos funcionais com efeitos específicos na saúde (LÖLIGER,1991).

A linhaça está sendo estudada por seus efeitos benéficos na saúde e é considerada um nutracêutico, pelo fato de ser uma fonte natural de fitoquímicos. A demonstração da atividade clínica associada com o consumo de linhaça tem estimulado interesse no estudo desta semente (CARAGAY, 1992). Portanto, há um grande interesse em promover um maior consumo de linhaça através da dieta pelo seu potencial benéfico na saúde, especificamente por seu efeito anticarcinogênico (BENNETT, 1998 e THOMPSON, 1996) e antiaterogênico (PRASAD, 1997; PRASAD *et al.*, 1998), vinculados ao conteúdo de lignanos e ácidos graxos ω -3 (YUAN, *et. al.*, 1999). Já, ARJMANDI *et al.*, (1998) e CUNNANE *et al.* (1995), consideram que os altos níveis de LNA, da fibra solúvel e dos constituintes não protéicos presentes na semente

de linhaça, possuem um papel importante na redução de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais são um fator de risco de doença cardiovascular.

Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar as ações dos lignanos “in vivo” incluindo as atividades antiestrogênica, anticarcinogênica e antioxidante. A atividade antioxidante dos lignanos, na linhaça, funcionaria não somente inativando os radicais livres dos ácidos graxos e espécies reativas de oxigênio, mas também, tendo um efeito indireto *in vivo* nos sistemas antioxidantes endógenos, por ex. enzima glutathiona (GSH). No entanto, enquanto os efeitos benéficos da linhaça e seus compostos tem sido demonstrados em modelos animais, os mecanismos bioquímicos desses efeitos permanecem para serem elucidados (YUAN *et al.*, 1999).

2.3 OXIDAÇÃO LIPÍDICA

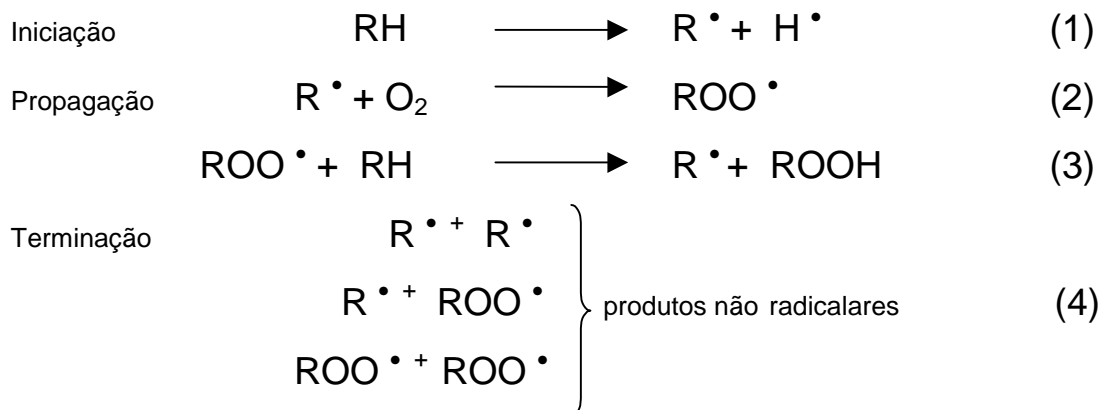
Os lípidos são suscetíveis ao ataque por radicais livres e a sua oxidação pode ser muito prejudicial devido a sua continuidade como uma reação em cadeia. Portanto, os lípidos contendo PUFA são particularmente propensos ao ataque de radicais livres (PAPAS, 1999) e à deterioração oxidativa, sendo utilizados na determinação da eficácia de antioxidantes naturais (WANASUNDARA e SHAHIDI, 1998). Na ausência de antioxidantes apropriados, os PUFA formam radicais livres e podem ter um efeito pró-oxidante significativo levando à depleção da vitamina E e aumento dos produtos de oxidação (MEYDANI, 1996; WANDER *et al.*, 1996). Por conseguinte, é um requisito necessário ter uma ingestão aumentada de antioxidantes para acompanhar um consumo elevado de ácidos graxos poliinsaturados para obter as ações benéficas dos mesmos (WISEMAN, 1996).

Os lípidos desempenham um papel importante na qualidade de certos produtos alimentares, particularmente em relação às propriedades organolépticas que os tornam desejáveis (sabor, odor, cor, textura). Além destas, conferem valor nutritivo aos alimentos, constituindo uma fonte de energia metabólica, de ácidos graxos essenciais e de vitaminas lipossolúveis. Portanto, o desenvolvimento de rancidez em óleos comestíveis é um problema

sério em alguns setores da indústria de alimentos devido ao acréscimo no uso de óleos poliinsaturados vegetais e de peixe, a interrupção do uso de antioxidantes sintéticos e a fortificação de alimentos a base de cereais contendo ferro (FRANKEL, 1996).

A oxidação lipídica, sendo um fenômeno espontâneo e inevitável, com uma implicação direta no valor comercial seja dos compostos graxos, seja de todos os produtos que a partir deles são formulados (SILVA *et al.*, 1999), conduz à mudanças que ocorrem durante o processamento, distribuição e preparação final dos alimentos. A oxidação de lípidos inicia também outras mudanças nos alimentos que afetam sua qualidade nutricional, segurança, cor, flavor e textura (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992). Este aspecto é de grande importância, não somente sob o enfoque econômico, através de perdas devido à diminuição da vida-de-prateleira, mas também pela possibilidade dos radicais livres formados reagirem ou interagirem com outros constituintes dos alimentos provocando uma queda na qualidade nutricional dos mesmos (NAWAR, 1996).

A autooxidação de lípidos polinsaturados de alimentos envolve uma reação em cadeia de radicais livres, que é freqüentemente iniciada pela exposição dos lípidos à luz, calor, radiação ionizante, íons metálicos ou catálise metalo-protéica. A enzima lipoxigenase pode também iniciar a oxidação. A rota clássica de autooxidação inclui reações de iniciação (produção de radicais livres dos lípidos), propagação e terminação (produção de produtos não radicalares), Reações 1-4, (SHAHIDI *et al.*, 1992).



Os radicais livres são moléculas que contêm um elétron não pareado, são espécies instáveis e reagem com diversos compostos. Os radicais livres de importância biológica inclui óxido nítrico, dióxigênio, superóxido e radicais hidroperóxido dos lípidos (THOMAS, 2000).

Os radicais livres e outras espécies reativas do oxigênio (ROS) no organismo são derivados provenientes do processo metabólico normal ou de fontes externas (KARAKAYA *et al.*, 2001). Portanto, essas ROS possuem um papel importante nos danos tissulares em humanos. A reação de ROS com biomoléculas tais como lípidos de membranas, proteínas e ácido deoxiribonucleico (DNA), pode provocar mudanças irreversíveis nas suas estruturas (IULIANO *et al.*, 1997). Assim, a peroxidação lipídica das membranas tem sido associada com muitas alterações de tecidos e doenças (CHIARPOTTO *et al.*, 1997; WEBER *et al.*, 1997).

Os ácidos graxos poliinsaturados são propensos à oxidação, resultando na formação de produtos como alcanos, aldeídos, álcoois e hidroperóxidos, além de, epóxidos, cetonas e ácidos (DORMANDY, 1994). Esta propensão surge do fato que os átomos de hidrogênio bis-aliílicos do grupo metileno são mais suscetíveis à abstração pelos radicais oxidáveis que os hidrogênios metilênicos dos lípidos totalmente saturados. Isto deve-se parcialmente a que os radicais livres resultantes têm estruturas de ressonância que aumentam sua estabilidade. Nas estruturas mais complexas, as duplas ligações são conjugadas e os radicais se situam no carbono metilênico adjacente. A reação

rápida dessas formas de ressonância com o oxigênio, leva às duplas ligações na estrutura conjugada a formar radicais peróxido nas posições +2 e -2 com relação ao átomo de carbono no qual ocorreu a abstração original (HOGG e KALYANARAMAN, 1999), (Figura 3).

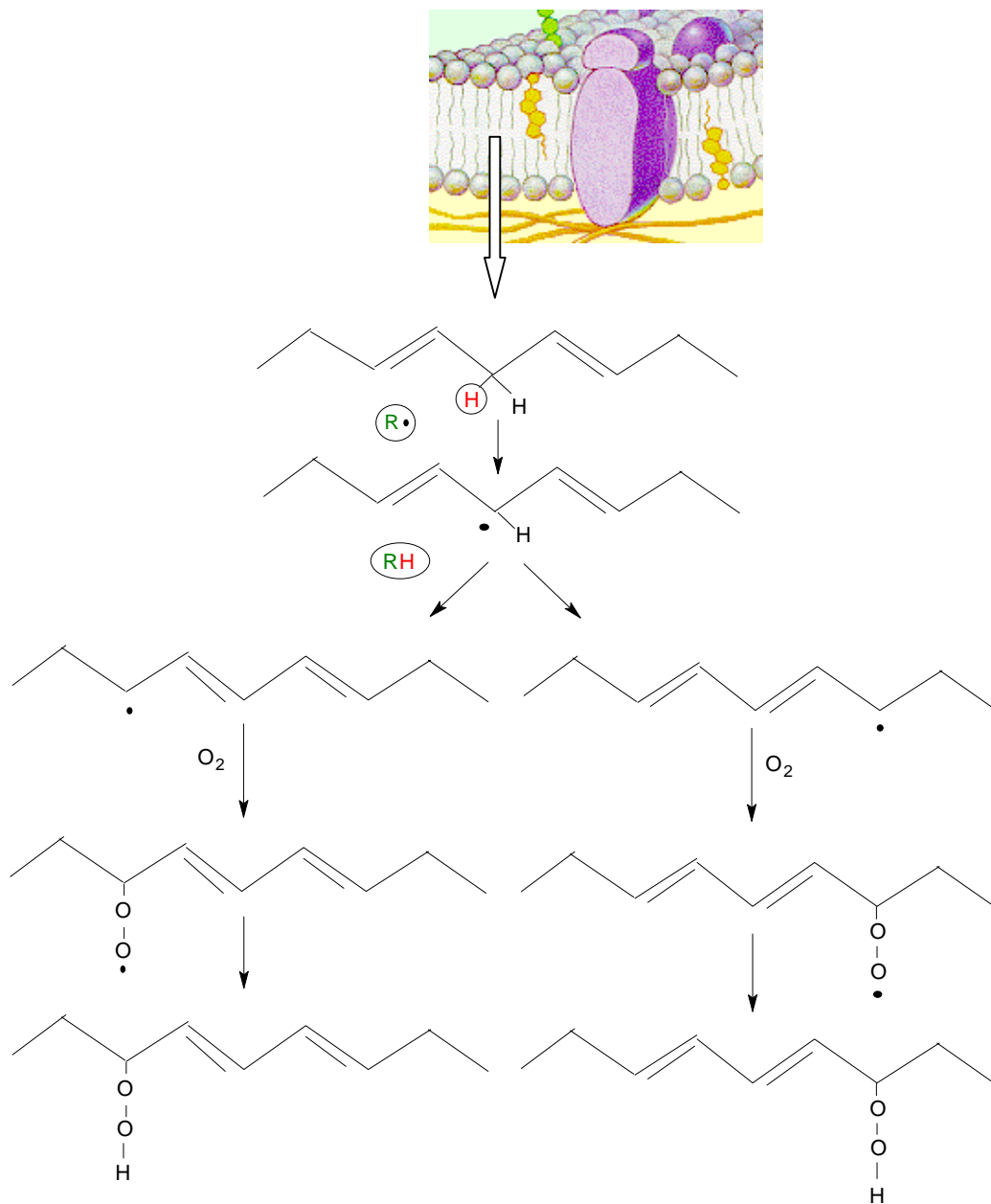


Figura 3. Peroxidação lipídica

2.4 ANTIOXIDANTES

Uma substância antioxidante pode ser definida como: 1) composto ou substância química que inibe a oxidação ou, 2) qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada a do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação do mesmo. Do ponto de vista biológico, podemos definir antioxidantes como compostos que protegem sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (ABDALA, 1993).

Atualmente, existe uma grande quantidade de compostos, tanto naturais quanto sintéticos, com propriedades antioxidantes, embora para seu uso em alimentos devem cumprir certos requerimentos, sendo um deles a segurança para a saúde (NAWAR, 1996).

Os antioxidantes tanto sintéticos quanto naturais são utilizados comumente em vários alimentos, especialmente nos que contêm óleos e gorduras. Os lípidos nos alimentos e particularmente os que contêm PUFA são facilmente oxidados (reação em cadeia). Os tocoferóis naturais, o α -tocoferol sintético e outros antioxidantes fenólicos (BHA, BHT, PG, TBHQ), são antioxidantes efetivos na iniciação da oxidação (PAPAS, 1993).

2.4.1 Mecanismos antioxidantes

O sistema de defesa antioxidante do organismo compreende uma gama variada de substâncias que atuam em diferentes níveis:

O sistema primário constitui-se em uma primeira linha de defesa formada por substâncias que impedem a geração de espécies reativas ou através da retirada das mesmas de forma a impedir sua interação com alvos celulares, ou seja, bloqueiam a etapa de iniciação da cadeia radicalar. Nesse grupo encontram-se: a) enzimas antioxidantes. b) quelantes e proteínas como a transferrina e a ceruloplasmina que transportam, respectivamente, ferro e cobre, impedindo que esses metais sejam liberados e catalizem a formação de

espécies oxidantes e c) substâncias não-enzimáticas como o ascorbato, albumina e carotenóides que seqüestram radicais superóxido e hidroxila, ou suprimem oxigênio singlete.

O sistema de defesa secundário é formado por compostos que atuam bloqueando a etapa de propagação da cadeia radicalar (chain breaking), seqüestrando radicais intermediários (ex. peroxil ou alcoxil). Esses antioxidantes geralmente são compostos fenólicos ou aminas aromáticas, entre eles estão o α -tocoferol, flavonóides e vários antioxidantes sintéticos (ABDALA, 1993).

Os produtos mais freqüentemente medidos são, hidroperóxidos e dienos conjugados, para a oxidação primária, e substâncias voláteis (TBARS) para a secundária (MOURE *et al.*, 2001). Portanto, a atividade antioxidante pode e deve ser determinada por diferentes testes para avaliação do estágio da oxidação. A maioria dos métodos químicos se baseia na capacidade de seqüestrar radicais livres, mas também a capacidade de quelação é responsável pela atividade antioxidante em sistemas lipídicos (CHEN e AHN, 1998).

2.4.2 Antioxidantes sintéticos

Os principais antioxidantes sintéticos utilizados habitualmente nos alimentos são os fenóis com várias substituições no anel (Figura 4). A eficácia de um antioxidante está relacionada com muitos fatores, como a energia de ativação, as constantes de velocidade, o potencial de óxido-redução, a facilidade com a qual pode-se destruir ou perder o antioxidante e a sua solubilidade. Os antioxidantes fenólicos são excelentes doadores de elétrons ou de hidrogênio e além disso, seus radicais intermediários são relativamente estáveis devido à deslocação por ressonância e à falta de posições moleculares apropriadas para serem atacados pelo oxigênio molecular.

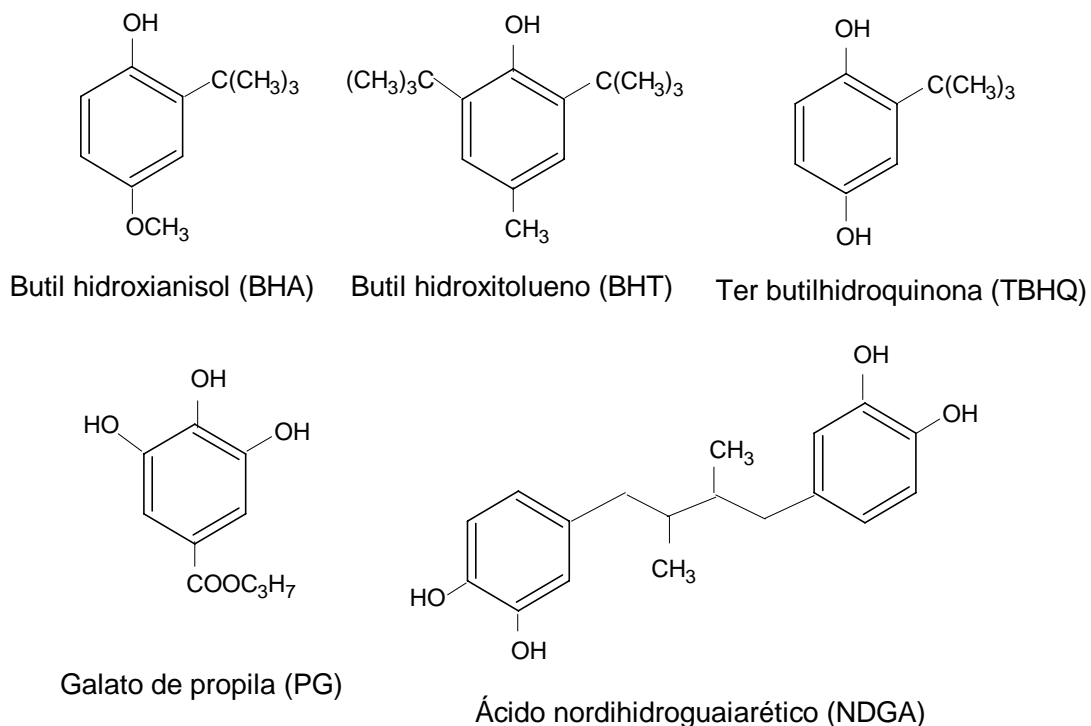


Figura 4. Estrutura química dos principais antioxidantes sintéticos

O fenômeno de sinergismo se produz quando uma mistura de antioxidantes têm uma atividade mais acentuada do que a atividade dos antioxidantes individuais. São conhecidos dois tipos de sinergismo, um deles que implica a ação de aceptores de radicais livres misturados e um outro que combina a ação de um aceptor de radical livre e um quelante de metais (NAWAR, 1996).

Estudos revelam que os antioxidantes BHA e BHT poderiam apresentar certa toxicidade e eficiência mais baixa que alguns antioxidantes naturais, junto com uma maior consciência dos consumidores com atenção na segurança dos aditivos nos alimentos, cria a necessidade de identificar fontes naturais alternativas de antioxidantes para alimentos (WANASUNDARA e SHAHIDI, 1998).

2.4.3 Antioxidantes naturais

A proteção dos lípidos frente à degradação autoxidativa é garantida pelos antioxidantes. O interesse na pesquisa por novos antioxidantes naturais tem aumentado nos últimos anos, levando às indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêuticas a ter maior atenção em novas fontes de antioxidantes naturais. Os compostos antioxidantes naturais tem sido isolados de diferentes partes de plantas tais como sementes, frutas, folhas e raízes. Bem como, muitos estudos tem sido realizados na determinação da sua ação antioxidante (DABROWSKI e SOSULSKI, 1984, CHEVOLLEAU, *et al.*, 1992, NAKATANI, 1992, PRATT, 1992, RAMARATHNAM *et al.*, 1995, HETTIARACHCHY, *et al.*, 1996, NAKATANI, 1997, XING e WHITE, 1997, MANCINI-FILHO, *et al.*, 1998, WETTASINGHE e SHAHIDI, 1999, MIRANDA *et al.*, 2001).

Nos alimentos, os antioxidantes naturais podem se originar de um ou mais compostos do próprio alimento (via endógena), de substâncias formadas de reações durante o processamento ou como aditivos isolados de fontes naturais (PRATT, 1992).

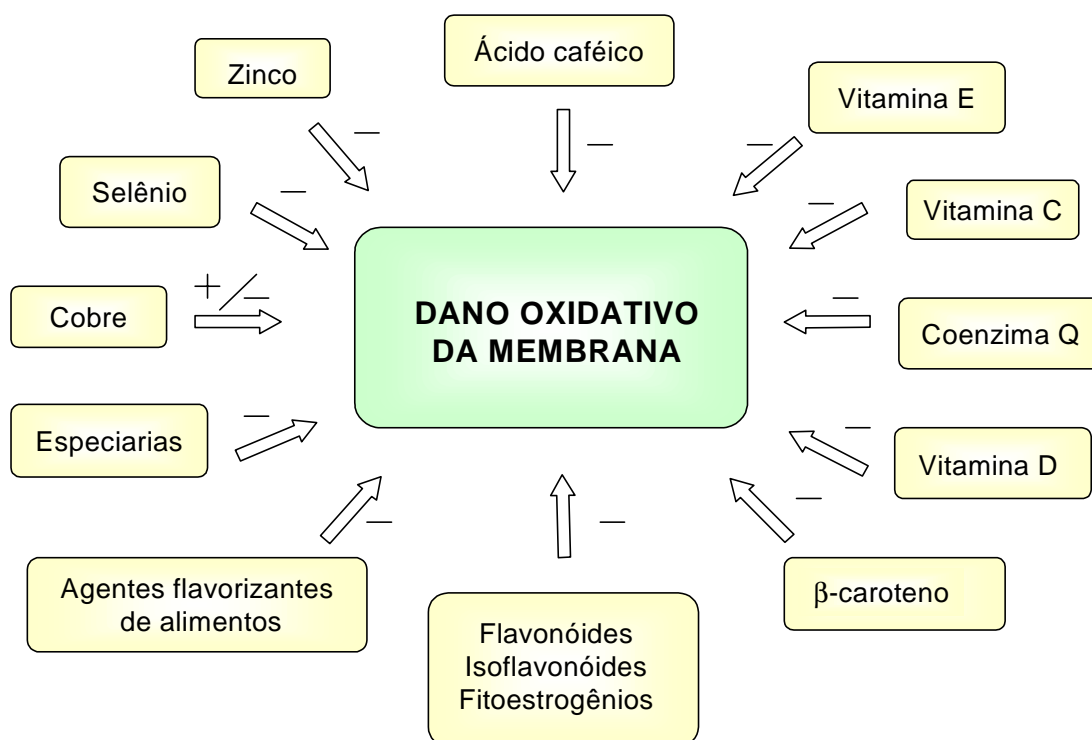
Os antioxidantes naturais podem funcionar como agentes redutores, como inibidores de radicais livres, como quelantes ou sequestrantes do oxigênio singlete e como desativadores de metais pró-oxidantes (KÄHKÖNEN, *et al.*, 1999; RICE-EVANS *et al.*, 1995; PRATT, 1992).

Sendo uma das características dos antioxidantes, retardar o desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis ocasionado pela oxidação de ácidos graxos insaturados, usualmente presentes como triacilgliceróis e/ou lípidos polares, hoje em dia há uma tendência geral, no processamento de alimentos, de substituir os antioxidantes sintéticos pelos inibidores da oxidação natural ou pelo uso preferencial de ingredientes que naturalmente possuem atividade antioxidante (TSALIKI, *et al.*, 1999).

Entre os antioxidantes naturais, os tocoferóis lipossolúveis têm sido estudados extensamente, mas, o interesse na pesquisa por novos antioxidantes naturais tem aumentado nos últimos anos. O reino vegetal é rico

em compostos fenólicos, os quais são encontrados em especiarias e folhas de plantas aromáticas de regiões quentes e secas (ECONOMOU, *et al.*, 1991). Também, extratos crus de frutas, ervas, vegetais, cereais e outros materiais ricos em fenólicos são de interesse na indústria de alimentos, pois estes retardam a degradação oxidativa de lipídes, melhorando deste modo a qualidade e o valor nutricional dos alimentos. Por conseguinte, existe um interesse crescente no isolamento, identificação e na utilização dos componentes antioxidantes de fontes naturais. YANISHLIEVA e MARINOVA, (1995), verificaram que ácidos fenólicos tais como o ferúlico, sinápico e caféico estão envolvidos em vários estágios das reações de iniciação e propagação durante a oxidação de triacilgliceróis puros e metil ésteres do óleo de girassol. Já, compostos fenólicos, incluindo flavonóides, ácido tânico e ácido elágico são encontrados em plantas e apresentam elevada atividade antioxidante em diversos sistemas biológicos (RAMANATHAN e DAS, 1992). Além disso, os compostos fenólicos de plantas podem reter ou retardar o início da oxidação lipídica, influenciando tanto na decomposição de hidroperóxidos nos alimentos, como também, em tecidos animais (WETTASINGHE e SHAHIDI, 1999). Muitos autores relataram que os extratos de várias sementes oleaginosas possuem propriedade antioxidante, a qual, em alguns casos exercem melhor efeito antioxidante que o observado pelos antioxidantes sintéticos nas mesmas concentrações (AMAROWICZ, *et al.*, 1993; OOMAH, *et al.*, 1995).

Para WANASUNDARA *et al.*, (1997), muitos são os componentes naturalmente presentes nos alimentos que apresentam atividade antioxidante, incluem flavonóides, precursores de lignanos, ácidos fenólicos, terpenos, tocoferóis, fosfolípides, etc. (Figura 5).



Fonte: WISEMAN (1996)

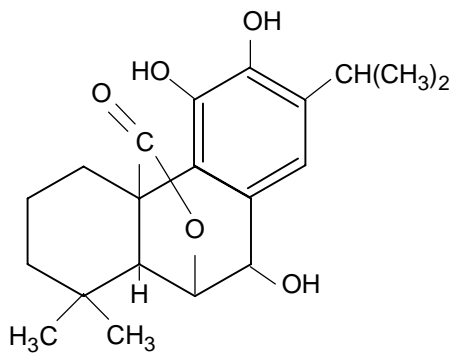
Figura 5. Proteção contra o dano oxidativo da membrana, mediada pela dieta

2.4.4 Especiarias como fonte de antioxidantes naturais

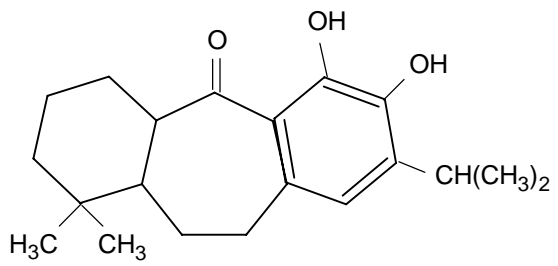
O termo especiaria é definido como material seco da planta que normalmente é acrescentado ao alimento para melhorar o “flavor” (MADSEN e BERTELSEN, 1995).

Desde antigamente, especiarias e ervas têm sido usadas não somente para melhorar o sabor e odor em alimentos e estender o tempo de prateleira, mas também pelas suas propriedades antisépticas e medicinais. O efeito de preservação das especiarias e ervas sugerem a presença de constituintes antioxidantes e antimicrobianos (NAKATANI, 1997), sendo que, segundo MADSEN e BERTELSEN (1995), a atividade antioxidante das especiarias é devido, principalmente, aos compostos fenólicos.

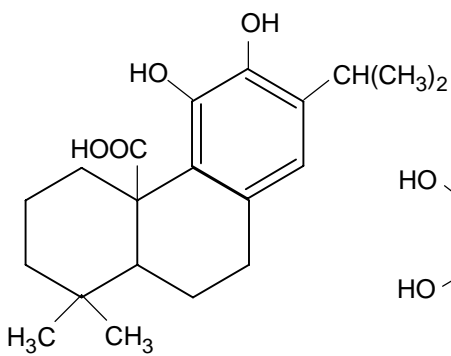
Um grande número de especiarias e ervas foram estudadas, entre elas alecrim, salvia, cravo, canela, orégano, gengibre, noz-moscada, para determinar a atividade antioxidante e identificar os compostos responsáveis pela atividade mencionada. As propriedades antioxidantes de ervas e especiarias são indicadas como efetivas para retardar o processo de peroxidação lipídica em óleos e alimentos gordurosos e têm ganho o interesse de muitos grupos de pesquisa (MILOS *et al.*, 2000). TSIMIDOU e BOSKOU (1994), concluíram que entre as ervas e especiarias extensamente estudadas, as plantas obtidas da família *Labiatae* possuem uma atividade antioxidante significativa. Os autores LAGOURI e BOSKOU, (1996), MILOS *et al.*, (2000), trabalharam com a especiaria orégano (*Origanum vulgare* L.) para detectar a presença de antioxidantes e a sua atividade. Já, com o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), FRANKEL *et al.*, (1996), estudaram a sua propriedade antioxidante e OFFORD *et al.*, (1997), determinaram a atividade antioxidante em sistemas lipídicos e não lipídicos. Os antioxidantes podem ser extraídos com êxito com diferentes solventes orgânicos tais como benzeno, clorofôrmio, éter dietílico e metanol. Os extratos das folhas de alecrim contêm um diterpeno fenólico, o carnosol. Além disso, o rosmanol, outro diterpeno fenólico, que tem uma estrutura que está intimamente relacionada ao carnosol e o rosmaridifenol foram também identificados nas folhas de alecrim (HOULIHAN *et al.*, 1984), (Figura 6). Os ácidos carnósico e rosmárico foram indicados como sendo os constituintes do alecrim de maior actividade antioxidante. Os extratos de antioxidantes comerciais (molecular ou destilado a vácuo) do alecrim estão disponíveis como um pó fino. Dependendo da quantidade de atividade dos antioxidantes, eles são recomendados para o uso nas concentrações entre 200 e 1000 ppm do produto processado (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992). As folhas secas do orégano foram sucessivamente extraídas com diclorometano e metanol e seus compostos antioxidantes foram isolados, sendo o principal composto identificado como um glicosídeo fenólico (KIKUZAKI e NAKATANI, 1989), (Figura 7).



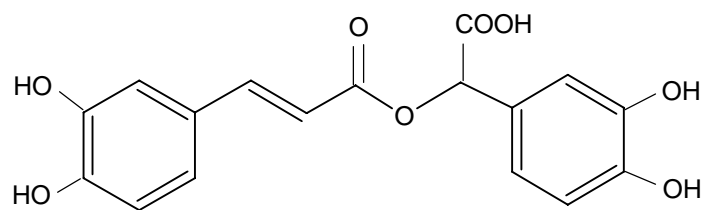
ROSMANOL



ROSMARIDIFENOL



ÁCIDO CARNÓSICO



ÁCIDO ROSMÁRICO

Figura 6. Estrutura química dos compostos antioxidantes no alecrim

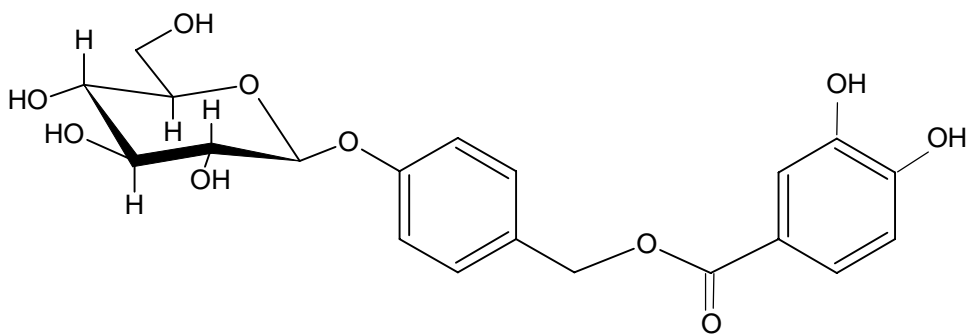


Figura 7. Estrutura química do glicosídeo fenólico antioxidante no orégano

2.5 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Alimentos funcionais são alimentos naturais ou produtos alimentícios elaborados que têm compostos bioativos que podem influenciar positivamente numa função humana atuando na prevenção ou tratamento de doenças ou desordens. Como um grande número de alimentos funcionais tem sido já introduzidos no mercado internacional, suas afirmações de serem benéficos para a saúde podem desafiar o limite tradicional entre alimento e medicina. Assim, a regulamentação do conceito de alimentos funcionais tem sido examinado baseado em conceitos internacionais e é geralmente aceito que estes alimentos devem fornecer benefícios à saúde além de seus valores nutricionais normais dentro do modelo dietético diário (KWAK e JUKES, 2001).

Os alimentos funcionais incluem esses produtos desenvolvidos com o objetivo de melhorar saúde, bem como a performance física. Segundo WILDMAN (2001), o “Institute of Medicine’s Food and Nutrition Board” definiu aos alimentos funcionais como “qualquer alimento ou ingrediente alimentício que pode providenciar um benefício para a saúde além dos nutrientes tradicionais contidos nele”.

2.5.1 Alimentos enriquecidos com ômega 3

A indústria de alimentos está já direcionada aos ácidos graxos essenciais ω -3 para o fornecimento de alimentos suplementados. É necessário considerar alguns itens envolvidos no enriquecimento dos alimentos com, como por exemplo, dosagem, segurança e fontes, para obter uma ingestão adequada destes ácidos (SIMOPOULOS, 2000).

Segundo, SIMOPOULOS (2000) e GARCIA (1998), atualmente, há muitos produtos no mercado, os quais são enriquecidos com PUFA ω -3, assim:

- a) Óleos ricos em ácido α -linolênico, tais como canola, linhaça e soja, levando a uma melhora na proporção ω -6/ ω -3.
- b) A farinha de linhaça e óleos de peixe encapsulados (ANDERSEN, 1995), são usados em produtos formulados. O enriquecimento com PUFA ω -3 de

produtos como, pão, cereais matinais, pasta, bolachas, bolos, sucos de frutas, entre outros, é possível através da microencapsulação.

- c) Fórmulas infantis. O leite humano contém todos os ácidos graxos polinsaturados, incluindo os dois ácidos essenciais linoléico e α -linolênico e também os PUFA de cadeia longa que têm mostrado ter efeitos benéficos em infantes prematuros e não prematuros. A busca de acrescentar LCPUFA em fórmulas infantis tem sido um desafio intelectual e técnico, devido a considerações relacionadas com dose, efeitos finais, bem como problemas técnicos de estabilidade e portanto a segurança para os infantes (MAKRIDES e GIBSON, 2001).
- d) Maionese, margarina e molhos de salada.
- e) Aves domésticas, gado e porcos estão sendo estudados no enriquecimento de suas carnes com ω -3 (NAM *et al.*, 1997; MANDELL *et al.*, 1998; ENSER *et al.*, 2000; WARNANTS *et al.*, 1998).
- f) Leite
- g) Ovos

Segundo GARCIA (1998), a incorporação de LCPUFA ω -3 (óleo de peixe) no alimento não é simples, já que são suscetíveis à oxidação, levando a sabores e odores fortes, não desejáveis. Mas, um manuseio cuidadoso dos compostos, modificações do processo e/ou mudanças na formulação podem ajudar a minimizar bastante esses problemas sensoriais.

2.5.2 Ovos enriquecidos com ômega 3

O ovo é uma fonte excelente de proteína de alta qualidade, além de outros nutrientes essenciais, como minerais e vitaminas, particularmente, vitamina B12 (FARRELL, 1997).

O ovo constitui uma fonte nutritiva valiosa e de baixo custo. Segundo TURATTI (2001), o ovo pode ser considerado como um alimento nutricional completo e é uma das melhores opções para amenizar os problemas de nutrição da América Latina. Em particular, da população pobre cujo consumo

de proteínas de origem animal é, em forma geral, baixo devido ao preço relativamente alto das carnes e dos laticínios (GARCIA e ALBALA, 1998).

O consumo de ovos nas sociedades ocidentais tem decrescido nas últimas décadas apesar da diminuição que tem experimentado o preço deste produto. Em vista do decréscimo do consumo *per capita*, entre 1987 e 1992 em muitos países do mundo (GARCIA e ALBALA, 1998) e da contínua controvérsia com relação aos níveis de colesterol na gema de ovo, muitos esforços têm sido feitos para diminuir a quantidade de colesterol nos ovos, com resultados mínimos (BORN, 1998).

Segundo TURATTI (2001), os ovos têm pouca influência nos altos níveis de colesterol sanguíneo ou nas doenças cardiovasculares, sendo os maus hábitos de alimentação, obesidade, vida sedentária, fumo, álcool e problemas genéticos, as verdadeiras causas dessas alterações. Sabe-se que, nosso corpo produz seu próprio colesterol diário, e estima-se que um adulto possua cerca de 140 gramas de colesterol em seu corpo. Portanto com um consumo de dois ovos por dia, correspondendo a 430 mg de colesterol (0,3%), haveria um aumento diário de colesterol sanguíneo de 1-2 mg/dl, valor que segundo este autor, é pouco significativo.

Um aspecto importante que deve ser considerado são as características organolépticas que os ovos apresentam, como cor, odor e sabor, as quais estão particularmente influenciadas pela dieta das aves. Os consumidores prestam grande atenção na cor da gema dos ovos, já que esta afeta a percepção na palatabilidade (BLOUNT *et al.*, 2000). A gema do ovo é pigmentada pelos carotenóides, que são pigmentos biologicamente ativos, os quais podem ser obtidos pelos animais através da dieta, já que eles são sintetizados *de novo* pelas plantas, certas bactérias e fungos. Além disso, no desenvolvimento das aves os carotenóides protegem aos tecidos vulneráveis, contra o dano causado pelos radicais livres, devido a sua ação antioxidante (WOODALL *et al.*, 1997; BLOUNT *et al.*, 2000). De acordo aos autores NARDONE e VALFRÈ (1999), em muitos países europeus é comum o uso de pigmentos de diferentes origens nas dietas de galinhas poedeiras. As xantofilas amarelas tais como luteína a zeaxantina, presentes em alguns ingredientes

alimentícios comumente usados nas dietas das aves, não conduzem aos níveis de pigmentação correspondentes ao valor de 11 na escala Roche, o nível mínimo de aceitação para países europeus.

As mudanças no estilo de vida e a maior consciência por uma saúde melhor, têm-se intensificado nos últimos anos. Hoje em dia, muita gente se questiona o que e quanto devem comer, criando um ambiente favorável para os produtos relacionados a um estilo de vida saudável como os ovos e carne de frango enriquecidos com ω -3 (BORN, 1998).

Devido aos efeitos na saúde que os PUFA ω -3 da dieta têm demonstrado, existe um esforço considerável para enriquecer produtos animais usando várias fontes destes ácidos graxos, tais como linhaça, canola, óleos de peixe. As indústrias de aves e de ovos, em particular, têm sido bastante responsáveis na procura de nova tecnologia para o enriquecimento de produtos conservando seu valor alimentício tradicional. Os chamados “designer eggs” ou “designer chicken meat”, acima de conservar as qualidades funcionais, nutricionais e sensoriais, têm uma composição lipídica significativamente alterada, incluindo a proporção de ácidos graxos poliinsaturados/saturados (P/S) e ω -6/ ω -3 nos produtos (SIM, 1998).

A manipulação nutricional das dietas das galinhas poedeiras para incluir fontes de PUFA ω -3, promove a incorporação desses nutrientes na gema de ovo. Portanto, os ovos enriquecidos podem fornecer uma fonte alimentícia alternativa para aumentar o consumo destes ácidos graxos essenciais (VAN ELSWYK, 1997). Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados visando a incorporação de PUFA ω -3 na gema, facilmente alcançado através da alimentação em galinhas poedeiras, com dietas contendo sementes oleaginosas como linhaça e canola (CHERIAN e SIM, 1991; CASTON *et al.*, 1994; AYMOND e VAN ELSWYK, 1995; QI e SIM, 1998; MORI, 2001) óleos de peixe (HARGIS *et al.*, 1991; VAN ELSWYK, 1997; BAUCCELLS *et al.*, 2000) e algas marinhas (HERBER e VAN ELSWYK, 1996; HERBER-MCNEILL e VAN ELSWYK, 1998). Assim, a composição lipídica da gema de ovo é o resultado de uma combinação de lipogênese *de novo* e incorporação dos componentes lipídicos através da dieta (SIM, 1998).

BORN (1998) expressa que os ovos ω -3 devem apresentar um perfil nutricional verdadeiramente superior quando comparados com os ovos tradicionais. Estes ovos devem exibir este perfil nutricional proveniente de dados de estudos e pesquisas independentes, para ganhar aceitação e estabelecer credibilidade entre consumidores, distribuidores, como também produtores.

Alguns estudos em humanos demonstram que o consumo de ovos enriquecidos com PUFA ω -3, oferecem efeitos benéficos na saúde, assim, apresenta diminuição da proporção ω -6/ ω -3 no plasma (FARRELL, 1998) e em fosfolípidos de plaquetas (FERRIER *et al.*, 1995), provoca marcada diminuição nos níveis de triglicerídeos no plasma sem mudanças do HDL colesterol e aumento significativo do DHA nos fosfolípidos nas plaquetas (FERRIER *et al.*, 1992), proporciona uma redução significativa da pressão sanguínea (OH *et al.*, 1991). Um estudo feito em mulheres no período de lactância demonstrou que, o conteúdo de PUFA ω -3 no leite aumenta sem alteração do colesterol ou triglicerídeos do plasma quando são consumidos ovos enriquecidos (CHERIAN e SIM, 1996). Desta maneira, estes ovos enriquecidos são fonte alternativa de PUFA ω -3 (LEWIS *et al.*, 2000).

Segundo SIMOPOULOS (2000), o desenvolvimento de uma variedade de alimentos ricos em ω -3, permitiria o aumento do consumo na dieta destes ácidos com pequena mudança dos hábitos dietéticos.

No passado, para a indústria de alimentos a produção e o processamento eram os itens de maior enfoque para o desenvolvimento de um alimento, no entanto, hoje em dia tem muita importância o aspecto nutricional. Esta mudança enfoca a necessidade de desenvolver pesquisa para a avaliação nutricional dos vários produtos, sendo essencial estabelecer a segurança dos alimentos considerando os possíveis efeitos adversos que podem ocorrer nos nutrientes devido a mudanças estruturais, como também a necessidade de obter uma proporção ω -6/ ω -3 apropriada na composição dos alimentos (SIMOPOULOS 1998). Além disso, no futuro haverá um aumento na base científica com ampla colaboração entre pesquisadores das áreas agrícola,

nutricional e médica para o desenvolvimento de novos alimentos (SIMOPOULOS, 2000).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Incorporar ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (PUFA ω -3) em ovos e tecidos de aves, através de dietas suplementadas com semente de linhaça e antioxidantes naturais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antioxidante da semente de linhaça e das especiarias, orégano e alecrim.
- Determinar o índice e o tempo máximo de incorporação dos PUFA ω -3 nas gemas de ovo de galinha.
- Determinar o grau de oxidação lipídica nos ovos enriquecidos com PUFA ω -3.
- Verificar a eficácia de antioxidantes naturais e sintéticos, incorporados na dieta simultaneamente com a fonte de PUFA ω -3.
- Avaliar a estabilidade lipídica dos ovos obtidos.
- Determinar o índice de incorporação dos PUFA ω -3 nos tecidos das galinhas alimentadas com linhaça.
- Determinar o grau de oxidação lipídica nos tecidos das galinhas alimentadas com linhaça.
- Realizar análise sensorial dos ovos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matéria-prima

A semente de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) foi adquirida em Agropam Comercial. As especiarias, orégano (*Origanum vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), foram adquiridos no mercado da cidade de São Paulo - SP.

Os antioxidantes sintéticos utilizados foram o butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT), das marcas Sigma e BDH Chemicals Ltd., respectivamente.

Os padrões de ácidos fenólicos e de ácidos graxos foram da marca Sigma. Foram utilizados reagentes analíticos das marcas Merck e Labsynth.

Para o ensaio biológico foram utilizadas 288 galinhas poedeiras da linhagem comercial Babcock de 22 semanas, as quais foram alimentadas com rações contendo as seguintes matérias-primas: milho, farelo de soja, calcário calcítico (38-40% cálcio), óleo de milho, fosfato bicálcico, sal, DL-metionina, Premix Roche, semente de linhaça, cujas quantidades estão indicadas na Tabela 5.

4.2 MÉTODOS

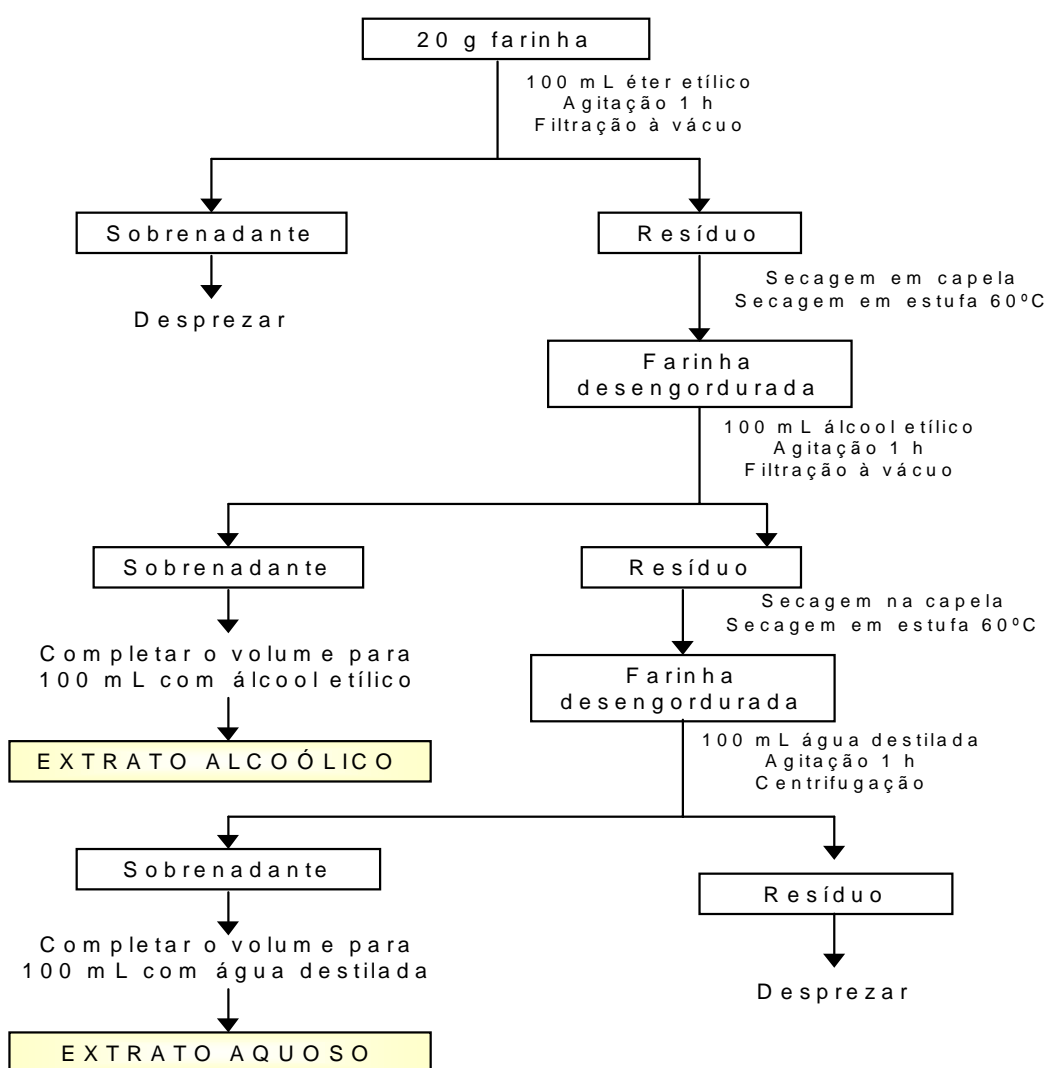
4.2.1 Preparação das farinhas de linhaça e de especiarias

A moagem da semente de linhaça foi realizada em moinho de facas, marca Marconi, utilizando-se uma peneira de 1,7 mm (\approx 8 mesh). Posteriormente, a farinha de linhaça foi armazenada em sacos plásticos em câmara fria a 4-6 °C. Já, o orégano e o alecrim foram moídos no micromoinho analítico Polymix A10 da Kinematica. As especiarias logo após tamizadas

numa peneira de 40 mesh, foram armazenadas em recipientes plásticos também à temperatura de refrigeração.

4.2.2 Preparação dos extratos da linhaça e das especiarias

A preparação dos extratos alcoólico e aquoso da semente de linhaça e do orégano e alecrim foi realizada através do processo de extração, de acordo a Figura 8.



Fonte: MANCINI-FILHO *et al.* (1998)

Figura 8. Obtenção dos extratos alcoólico e aquoso das farinhas de linhaça e das especiarias

4.2.3 Determinação da composição centesimal da linhaça

A composição centesimal da linhaça foi determinada conforme a seguir:

Umidade: realizada em uma estufa a 105°C, até peso constante, segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985);

Proteína: pelo método de microkjeldahl, segundo a AOAC (1995);

Lípides: usando o método Soxhlet (solvente: éter etílico), segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985);

Cinzas: realizada pela incineração em mufla a 550 °C, segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985);

NIFEXT: foi obtida pela diferença entre 100 e o somatório das determinações de umidade, gordura, proteína e cinzas.

4.2.4. Determinação do teor de matéria seca dos extratos de linhaça e de especiarias

A determinação do peso seco dos diferentes extratos foi feita utilizando-se um volume de 1 mL em vidros de relógio tarados. As amostras foram colocados em estufa a 105 °C, por 2 horas, para a evaporação do solvente. Logo após os vidros de relógios foram pesados até o peso constante, segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

4.2.5 Determinação da atividade antioxidante dos extratos de linhaça e de especiarias

A determinação da atividade antioxidante foi realizada “*in vitro*”, no sistema β -caroteno/ácido linoléico, segundo MARCO (1968) e modificado por MILLER (1971). Os volumes utilizados dos extratos nas diferentes amostras foram 0,05 e 0,1 mL. Estas determinações foram feitas junto a um branco (sem antioxidante) e um controle (0,05 e 0,1 mL de BHT em uma concentração de 100 ppm). A avaliação do efeito sinergista, da atividade antioxidante dos extratos foi realizada através da associação com os antioxidantes sintéticos.

As porcentagens de atividade antioxidante foram calculadas de acordo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ AA} = 100 - \frac{(\text{D.O. inicial} - \text{D.O final}) \text{ amostra}}{(\text{D.O inicial} - \text{D.O final}) \text{ branco}} \times 100$$

Onde:

% AA = porcentagem da atividade antioxidante

4.2.6 Determinação dos compostos fenólicos na linhaça e nas especiarias

A obtenção das frações dos compostos fenólicos, ácidos fenólicos livres (AFL), ácidos fenólicos solúveis (AFES) e ácidos fenólicos insolúveis (AFEI), através de uma extração seqüencial, foi realizada segundo a técnica proposta por DABROWSKI e SOSULSKI (1984). A mistura de padrões foi preparada numa concentração de 1 mg/mL (Tabela 3). Utilizou-se como padrão interno o ester metílico do ácido heptadecanóico. Tanto a mistura padrão quanto as amostras foram derivatizadas através da adição de 500 µL de N,O,-bis (Trimetilsilil)-acetamida, seguidas de aquecimento em banho maria, a 60 °C, durante 30 minutos. Após este tempo as amostras estiveram prontas para serem injetadas no cromatógrafo a gas com ionização de chama, marca Shimadzu, modelo GC17A.

Os ácidos fenólicos das amostras foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões correspondentes.

Condições cromatográficas:

Coluna: capilar de sílica fundida, semipolar DB-5, polimetilfenilsiloxana (30 m comp. x 0,25 mm diâmetro interno)

Detetor: ionização de chama

Programação da coluna: temperatura inicial de 150 °C, mantida por 3 min; aumento até 300 °C à razão de 5 °C/min, mantida por 3 min.

Gás de arraste: hélio, com um fluxo de 1 mL/min.

Temperatura do injetor: 310 °C.

Temperatura do detetor: 320 °C.

Para a confirmação dos ácidos fenólicos identificados foi utilizada cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa QP5000, software Class 5000. A identificação dos ácidos fenólicos presentes nas amostras foi realizada com base nas bibliotecas NIST12.LIB, NIST62.LIB e USP.LIB. Esta determinação foi realizada no Laboratório de Cromatografia da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz.

Tabela 3. Mistura de padrões de ácidos fenólicos

No.	ÁCIDO FENÓLICO	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)
1	Salicílico	1,00
2	Trans-cinâmico	1,00
3	p-hidroxibenzóico	1,00
4	Vanílico	1,00
5	Gentísico	1,00
6	o-cumárico	1,00
7	Protocatequínico	1,14
8	(-) quínico	1,00
9	p-cumárico	1,12
10	Gálico	1,00
11	Ferúlico	1,00
12	Caféico	1,05
13	Sinapínico	1,00
14	Catequínico	1,00
15	Clorogênico	1,00

4.2.7 Estudo de estabilidade da linhaça

Para o estudo de estabilidade da linhaça foi testada uma amostra de farinha de linhaça, submetida a quatro condições diferentes: (1) crua, armazenada à

temperatura ambiente; (2) cozida, armazenada à temperatura ambiente; (3) crua, armazenada à temperatura de refrigeração; e (4) cozida, armazenada à temperatura de refrigeração. Este estudo foi realizado nos tempos 0, 7, 16 e 46 dias de armazenamento.

Para o cozimento da linhaça, primeiro a semente foi embebida em água por 15 horas. Depois foi submetida a cozimento por fervura durante 15 minutos. A secagem da linhaça foi realizada em estufa a 60 °C com ventilação por 3 horas. Logo após, realizou-se a moagem tanto da linhaça cozida e seca quanto da crua, no micromoinho analítico Polymix A10 da Kinematica.

4.2.7.1 Determinação do perfil de ácidos graxos

Esta determinação foi realizada na farinha de linhaça nas 4 condições mencionadas anteriormente, nos tempos inicial e final, 0 e 46 dias, respectivamente. A esterificação dos ácidos graxos do óleo extraído da linhaça pelo método de Soxhlet (solvente: éter etílico), foi realizada segundo a técnica proposta por HARTMAN e LAGO, 1973. Para esta determinação foi utilizado o cromatógrafo gasoso marca Shimadzu, modelo GC17A.

Condições cromatográficas:

Coluna: capilar de sílica fundida, Carbowax 20M (30 m x 0,25 mm d.i)

Detetor: ionização de chama

Programação da coluna: temperatura inicial de 80 °C, aumento até 150 °C à razão de 10 °C/min. Aumento da temperatura até 230 °C à razão de 6 °C/min e mantida por 30 min.

Gás de arraste: hélio, com um fluxo de 1 mL/min.

Temperatura do injetor: 250 °C.

Temperatura do detetor: 250 °C.

Os metil ésteres dos ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção de padrões.

4.2.7.2 Determinação do grau de oxidação

Para avaliar a extensão da oxidação dos lípidos nas amostras de linhaça, realizou-se o teste do ácido tiobarbitúrico TBA, segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985), nas 4 diferentes condições e nos 4 tempos (0, 7, 16 e 46 dias). Utilizou-se tetraetoxipropano (TEP) a uma concentração de 1×10^{-5} M para a elaboração da curva padrão (Tabela 4). A técnica utilizada neste teste teve algumas adaptações (Figura 9).

Tabela 4. Curva padrão do TEP 1×10^{-5} M

Volume de TBA (mL)	Volume de TCA (mL)	Volume de TEP (mL)	Concentração (mg)
1,25	3,5	0,5	0,0011
1,25	3,0	1,0	0,0022
1,25	2,5	1,5	0,0033
1,25	2,0	2,0	0,0044
1,25	1,5	2,5	0,0055
1,25	1,0	3,0	0,0066

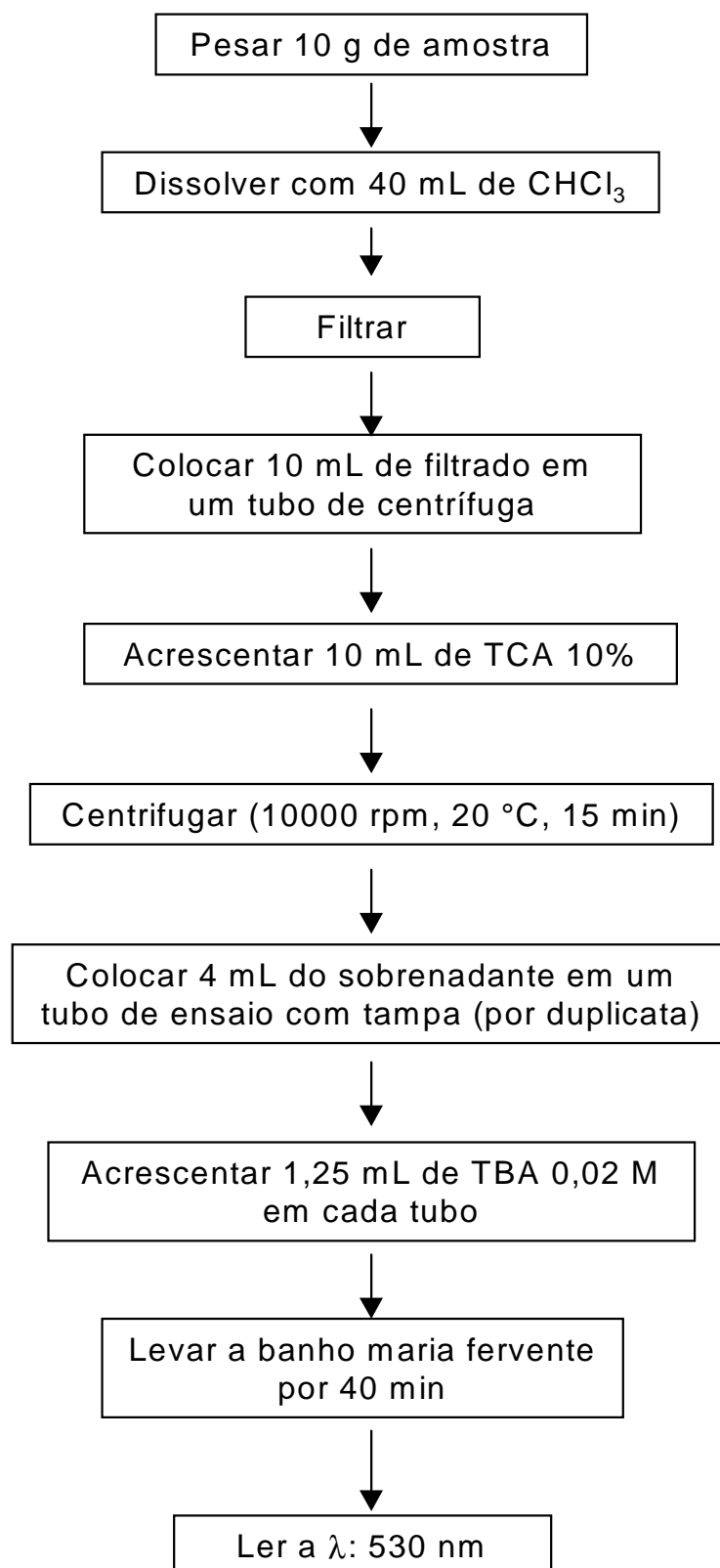


Figura 9. Teste do TBA, utilizado nas amostras de linhaça

4.2 8 Ensaio biológico

4.2.8.1 Preparação das rações

Foram preparadas 3 rações isocalóricas e isoprotéicas de acordo às tabelas NRC (Nutrition Research Council, 1994), contendo 0 (zero), 5 e 10% de óleo de linhaça, que corresponde a 0, 12,69 e 25,38%, respectivamente, de semente de linhaça moída, suplementadas à dieta basal de milho e soja. Para obter as formulações e calcular a quantidade de energia metabolizável, proteína bruta, metionina, cálcio, fósforo e fibra foi utilizado o programa de computação CRAC/TD Software Limitada (Tabela 5).

Esta preparação foi realizada em misturadores, modelo convencional, marca Osório de 500 Kg de capacidade, na fábrica Rações Pássaros da cidade de São Paulo - SP.

Tabela 5. Formulações das rações em porcentagem

MATÉRIA PRIMA	FORMULAÇÃO I 0% óleo linhaça	FORMULAÇÃO II 5% óleo linhaça	FORMULAÇÃO III 10% óleo linhaça
Milho (fubá)	55,84	49,74	42,46
Farelo de soja-45	27,02	23,32	19,86
Calcário calcítico	9,94	9,88	9,92
Óleo de milho	5,00	2,08	-
Fosfato bicálcico	1,36	1,37	1,49
Sal	0,40	0,38	0,27
DL-metionina	0,15	0,24	0,31
Premix Roche*	0,30	0,30	0,30
Semente de linhaça	-	12,69	25,38
Análise calculada			
Energia metabolizável (Kcal/Kg)	2930	2900	2905
Proteína bruta	17,00	17,00	17,00
Metionina	0,52	0,57	0,61
Metionina + Cistina	0,70	0,72	0,72
Cálcio	4,20	4,20	4,26
Fósforo total	0,56	0,59	0,64
Fósforo disponível	0,35	0,34	0,35
Fibra	2,75	3,04	3,32

(*) Premix vitamínico, mineral e de aminoácidos fornece (por Kg de dieta): vitamina A, 7950 UI; vitamina D3, 2559 UI; vitamina E, 10,5 mg; vitamina K3, 2,6 mg; riboflavina, 5 mg; vitamina B12, 12 mcg; ácido nicotínico, 25 mg; ácido pantotênico, 8 mg; ferro, 50 mg; cobre, 10 mg; zinco, 50 mg; manganês, 80 mg; iodo, 1 mg; cobalto, 1 mg; selênio, 0,15 mg; metionina, 0,9 g; colina, 0,1 g; antioxidante, 30 mg.

A partir de cada uma das rações, foram preparadas três formulações contendo uma mistura de antioxidantes sintéticos: BHA 100 ppm + BHT 100 ppm, orégano 200 ppm e alecrim 200 ppm, em separado. Resultando em nove tratamentos, cada grupo com seu respectivo controle (sem antioxidante), assim:

- Controle 0% linhaça
- 0% linhaça + BHA / BHT (1)
- 0% linhaça + orégano (2)
- 0% linhaça + alecrim (3)
- Controle 5% linhaça
- 5% linhaça + BHA / BHT (4)
- 5% linhaça + orégano (5)
- 5% linhaça + alecrim (6)
- Controle 10% linhaça
- 10% linhaça + BHA / BHT (7)
- 10% linhaça + orégano (8)
- 10% linhaça + alecrim (9)

A preparação destas formulações foi feita em misturadores em V, marca Pilat, com capacidade de 30 Kg.

4.2.8.1.1 Determinação da composição centesimal das rações

A determinação da composição centesimal das diferentes rações está descrita no item 4.2.3.

4.2.8.1.2 Determinação do teor de matéria seca dos extratos das rações

A peso seco dos extratos foi determinado como descrito no item 4.2.4.

4.2.8.1.3 Determinação da atividade antioxidante dos extratos das rações

A técnica para determinar a atividade antioxidante das rações está descrita no item 4.2.5.

4.2.8.2 Experimento

O experimento foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para o qual foram utilizadas 288 galinhas poedeiras da linhagem comercial Babcock de 22 semanas, as quais foram divididas em 12 grupos, ($n = 24$), mantidas em gaiolas individuais e alimentadas *ad libitum* com as dietas acima citadas, durante 30 dias.

4.2.8.3 Amostragem

A amostragem dos ovos foi realizada durante os 30 dias do experimento, dividido em 4 períodos (0, 10, 20 e 30 dias). Dos ovos recolhidos, 144 ovos (8 ovos por tratamento nos tempos 0 e 30 dias) foram enviados ao Laboratório de Análise Sensorial da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, em cartelas de isopor e armazenados inteiros com a casca e crus, sob temperatura de refrigeração (7 ± 3 °C), até a execução das análises. Uma outra parte da amostragem (12 por tratamento nos 4 períodos foram recolhidos para o estudo de estabilidade e 6 por tratamento, também nos 4 períodos, para a determinação dos ácidos graxos e grau de oxidação lipídica) foi armazenada em câmara fria (temperatura de refrigeração), para depois, as gemas dos ovos serem liofilizadas, a uma temperatura de congelamento de -70 °C e temperatura máxima de 20 °C durante 24 horas e armazenadas no freezer a -18 °C até a realização das análises.

Uma vez finalizado o experimento de 30 dias, realizou-se o sacrifício das aves (duas por tratamento). Os tecidos das aves, sobrecoxa, coxa, asa, peito (recolhidos junto com a pele), coração, tecido adiposo e fígado, envolvidos individualmente em papel alumínio, foram colocados em um recipiente com

nitrogênio líquido, para serem estocados posteriormente, em freezer a -80 °C, até que as análises fossem feitas.

4.2.9 Determinação do perfil dos ácidos graxos nas gemas de ovo

A determinação do perfil dos ácidos graxos nas gemas de ovo foi realizada por cromatografia gasosa utilizando-se o método de metilação direta de acordo a WANG *et al.* (2000), seguindo o seguinte esquema: pesar aproximadamente 50 mg de gema de ovo (15 mg de lípidos \approx 30% de lípidos na gema de ovo fresco) em um tubo de esterificação. Acrescentar o padrão interno (foi utilizado o ácido nonadecanóico C19:0) 2,0 mg/mL de hexano. Colocar 1 mL de metanol e 3 mL de HCl metanólico 3N. Fechar e apertar firmemente os tubos e levar a banho maria a 95 °C por 1 hora. Resfriar a temperatura ambiente e acrescentar 8 mL de uma solução de NaCl 0,88% e 3 mL de hexano e misturar bem em um agitador de tubos. Deixar em repouso até separação das fases. Recolher a camada superior e armazenar em vidro âmbar. A amostra está pronta para ser injetada no cromatógrafo gasoso.

Condições cromatográficas:

Coluna: capilar de sílica fundida, Carbowax 20M (30 m x 0,25 mm d.i)

Detetor: ionização de chama

Programação da coluna: temperatura inicial de 70 °C, mantida por 3 min; aumento até 180 °C à razão de 30 °C/min; e mantida por 10 min. Aumento da temperatura até 230 °C à razão de 5 °C/min e mantida por 15 min.

Gás de arraste: hélio, com um fluxo de 3 mL/min.

Temperatura do injetor: 230 °C.

Temperatura do detetor: 240 °C.

Os metil ésteres dos ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões. O conteúdo dos ácidos graxos das

gemas de ovo, expresso em (mg de ácido graxo/g de gema) foi calculado de acordo a seguinte fórmula:

$$\text{mg/g} = \frac{\text{área pico AG} \times \text{concentração pi (mg/mL)}}{\text{área pico pi} \times \text{peso amostra (g)}}$$

Onde:

AG = ácido graxo

pi = padrão interno

4.2.10 Determinação do grau de oxidação das gemas de ovo

Para avaliar a extensão da oxidação dos lipídeos nas amostras de gemas de ovo, foi realizado o teste do ácido tiobarbitúrico, TBA, segundo WYNCKEL (1970) e RAMANATHAN e DAS (1992) com algumas adaptações (Figura 10).

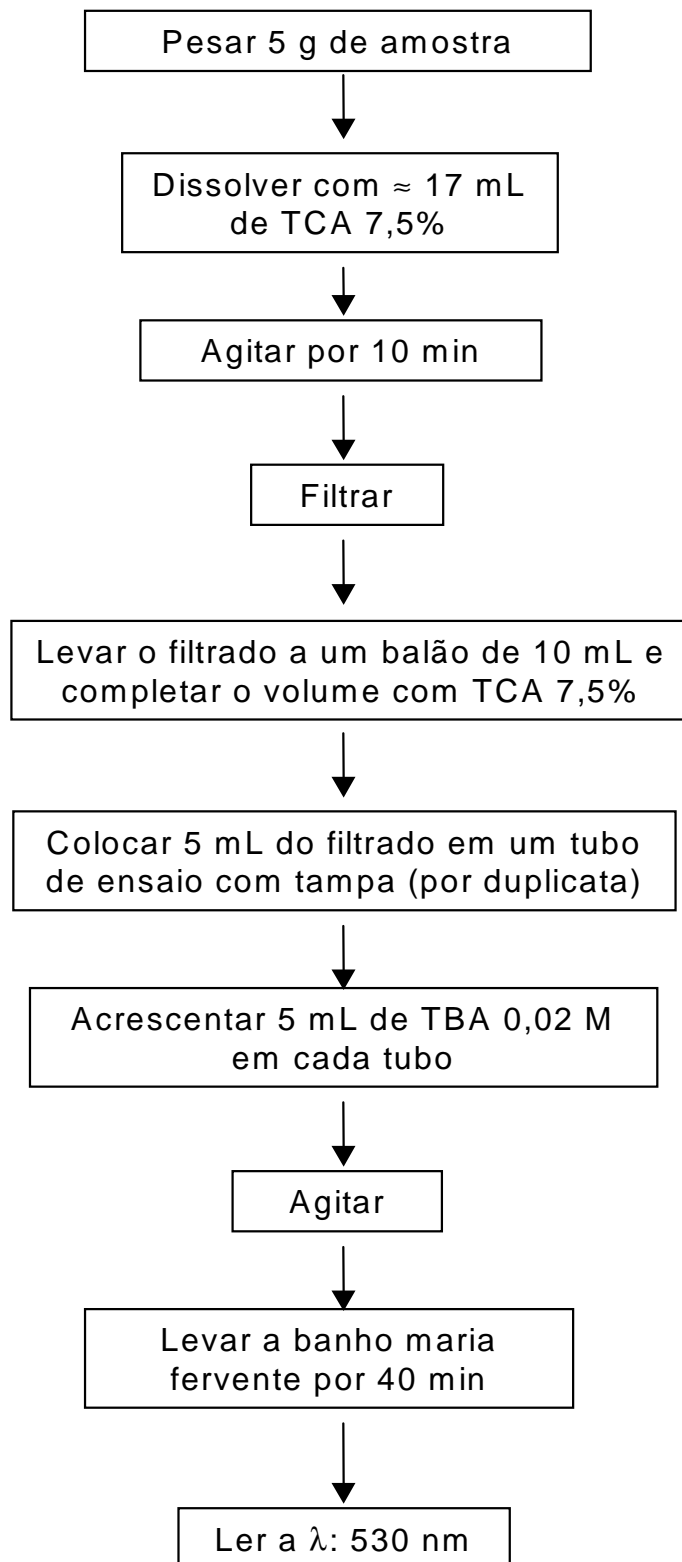


Figura 10. Teste do TBA, utilizado nas gemas de ovos

4.2.11 Tempo de armazenamento das gemas de ovo

O tempo de armazenamento das gemas liofilizadas dos ovos correspondentes aos tempos de alimentação das aves de 0, 10, 20 e 30 dias, foi realizado a temperatura ambiente (20-25 °C), em quatro períodos de armazenamento 0, 10, 20 e 40 dias, um total de 16 tempos.

4.2.11.1 Determinação do perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa, prévia metilação direta, como descrito no item 4.2.9.

4.2.11.2 Determinação do grau de oxidação

A determinação da rancidez oxidativa na fração lipídica das gemas de ovo foi realizada de acordo ao item 2.4.10.

4.2.12 Determinação do perfil de ácidos graxos nos tecidos das aves

A fração lipídica dos diferentes tecidos das aves foi extraída segundo o método descrito por Folch *et al.* (1957). A obtenção dos ésteres dos ácidos graxos, foi realizada de acordo com o método de HARTMAN e LAGO (1973). Os metil ésteres foram extraídos com hexano, para serem injetados no cromatógrafo gasoso para sua identificação usando padrões para a comparação dos tempos de retenção.

Condições cromatográficas: de acordo ao item 4.2.7.1.

4.2.13 Determinação do grau de oxidação nos tecidos das aves

A determinação da peroxidação lipídica nos tecidos das aves (sobrecosta, coxa, asa, peito, coração, tecido adiposo e fígado) dos diferentes grupos experimentais, foi conduzida através da medida da concentração de malonaldeído (MDA) relacionada com a quantidade de proteína.

4.2.13.1 Quantificação de MDA nos tecidos das aves

Os métodos descritos por WINTERBOURN et al., (1985) e LYNCH e FREI (1993) foram utilizados como referência para determinar o conteúdo de MDA nos tecidos das aves (ver Figura 11). Foi elaborada uma curva padrão com 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) em uma concentração de 6×10^{-6} M (Tabela 6), para calcular as concentrações de MDA expressas em μmol .

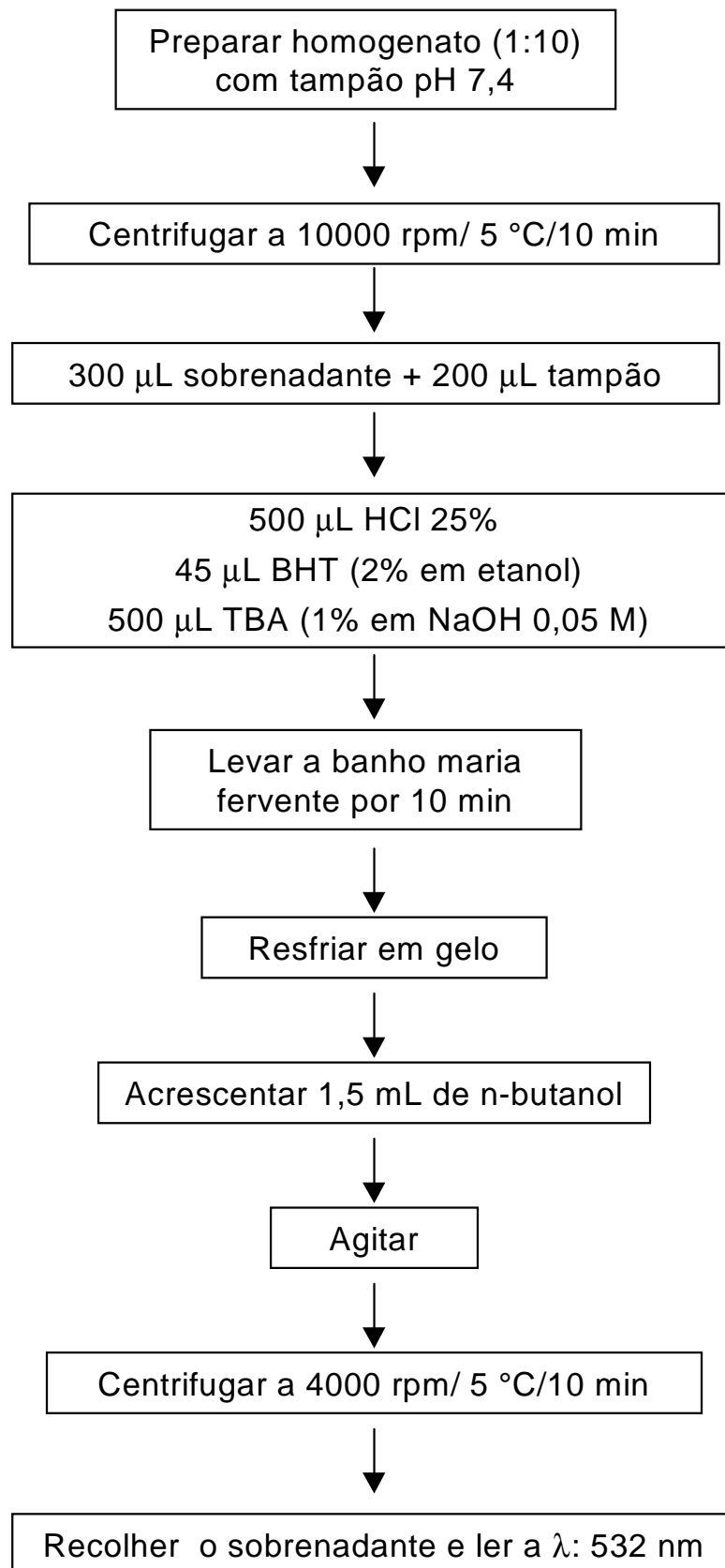


Figura 11. Teste do TBA, utilizado nos tecidos das aves

Tabela 6. Curva padrão do TMP 6×10^{-6} M

Volume de TMP (μL)	Volume de tampão (μL)	Concentração (μM)
100	400	1,2
150	350	1,8
200	300	2,4
250	250	3,0
300	200	3,6

4.2.13.2 Quantificação de proteína nos tecidos das aves

Para a determinação do conteúdo de proteína nos tecidos, foi realizado segundo o método de BRADFORD (1985).

Foram realizadas as diluições com água dos homogenatos dos diferentes tecidos, numa proporção para obter uma densidade ótica de aproximadamente 0,250. Em seguida foram tomados 100 μL da diluição e acrescentado 1 mL do reagente de Bradford preparado numa relação de 1:10 em água destilada. Foi preparado também um branco (por duplicata) com 100 μL de solução salina e 1 mL do reagente de Bradford. Além disso, para a quantificação de proteína, expressa em mg/mL, foi elaborada uma curva padrão com albumina bovina (BSA, fração V, mínimo 96% por eletroforese) na concentração de 0,9220 mg/mL (Tabela 7). As absorvâncias, tanto das amostras quanto do branco e da curva padrão foram lidas a um comprimento de onda de 595 nm.

Tabela 7. Curva padrão de albumina

Volume de BSA (μL)	Volume de água (μL)	Concentração (mg/mL)
10	990	0,0092
20	980	0,0184
30	970	0,0277
40	960	0,0369
50	950	0,0461
60	940	0,0553
80	920	0,0738

4.2.13.3 Cálculo da concentração de malonaldeído (MDA) relacionada com a quantidade de proteína

O cálculo das concentrações de MDA e proteína nos diferentes tecidos, foi determinado através da equação da reta ($y = ax + b$) baseada nas curvas padrão de TMP e albumina, respectivamente. Estas concentrações foram relacionadas para expressar a oxidação lipídica nos diferentes tecidos, como μmol de MDA/mg de proteína.

4.2.14 Análise sensorial das gemas de ovo

4.2.14.1 Avaliação sensorial da aparência, odor e sabor

Uma equipe formada por 29 julgadores com acuidade visual normal para cores (FARNSWORTH-MUNSELL COLOR, MACBETH), poder discriminativo para reconhecimento e ordenação dos gostos básicos (ISO/DIS 3972, 1990) e capacidade de identificação de odores, foram recrutados entre os funcionários do Serviço de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. Esta equipe, com idades variando entre 20 e 45 anos, sendo cinco do sexo masculino e os demais do sexo feminino, foi utilizada para avaliar sensorialmente as amostras

de gemas cozidas e amassadas dos ovos recolhidos no tempo inicial (0 dias) e tempo final (30 dias) do experimento. Estas amostras foram utilizadas para as avaliações da aparência, odor e sabor (Figura 12).

Para os atributos de aparência, odor e sabor, aplicou-se o teste de Comparação Múltipla ou Diferença-do-Controle (Anexo 1) preconizado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1995). As amostras foram apresentadas segundo o delineamento de Blocos Completos Casualizados. Os provadores receberam a amostra padrão (controle de zero dia) especificada com a letra P e três amostras codificadas com algarismos aleatórios de três dígitos. Solicitou-se que avaliassem cada uma das amostras-teste em relação à amostra-controle, comparando-as segundo o atributo específico e através de uma escala (0 = nenhuma diferença de P a 8 = extremamente diferente de P). Uma amostra idêntica ao padrão foi introduzida entre as amostras codificadas.

4.2.14.2 Avaliação da intensidade da cor amarela das gemas de ovos

A avaliação da cor amarela das gemas foi realizada utilizando uma escala gráfica não estruturada linear simples de 10 cm ancorada nos extremos pelos termos “clara” e “escura” (Anexo 2). Solicitou-se aos julgadores que avaliassem o grau de diferença em relação à cor amarela das amostras (Figura 13).

4.2.14.3. Avaliação instrumental da cor das gemas de ovos

Utilizou-se na determinação um espectrofotômetro, marca Minolta, modelo CM-508d, estabelecendo-se como condições de medida iluminante D₆₅ (luz do dia) e ângulo de observação de 10° (Figura 14). O sistema de avaliação da cor foi da CIE (Comission Internationale de l'Eclairage) onde, L*, a* e b* correspondem à luminosidade, cores vermelha/verde e amarela/azul, respectivamente. Foram avaliadas quatro metades de gemas cozidas cortadas longitudinalmente, com triplicata da leitura.



Figura 12. Análise sensorial da aparência, odor e sabor das gemas de ovo



Figura 13. Avaliação da intensidade da cor amarela das gemas de ovo



Figura 14. Análise instrumental da cor das gemas de ovo

4.2.15 Análise estatística

Os resultados das diferentes análises foram apresentados como média e desvio padrão. Estas avaliações, como também a determinação dos coeficientes de correlação foram realizados através do programa Microsoft Excel, versão 5.0. Já, as análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias através dos testes de Tukey-Kramer e Dunnett, foram realizados utilizando o programa GraphPad InStat, versão 2.01. No entanto, o teste de comparação entre as médias obtidas das amostras pareadas foi o teste *t Student*, onde se fixou um nível de erro de 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA LINHAÇA

A composição centesimal da semente de linhaça está apresentada na Figura 15. Como pode-se observar, o componente de maior porcentagem nesta semente oleaginosa é a fração lipídica que, segundo WANASUNDARA *et al.*, (1997), é a maior fonte energética para a sobrevivência do material genético da semente.

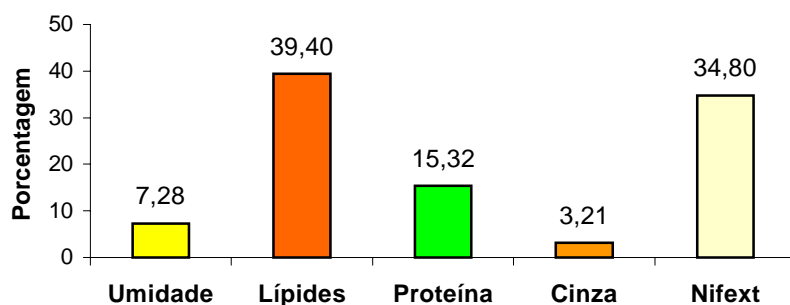


Figura 15. Composição centesimal da semente de linhaça

Os resultados obtidos na composição centesimal da linhaça, estão bastante próximos aos dados apresentados por HANDS, (1996), sendo estes, 6,3% de umidade, 4,5% de cinzas, 18% de proteínas, 34% de lípides e 37,2% de nifext.

Já, BENNETT (1998), menciona que a maioria das variedades de linhaça contém uma média de 41% de lípides, 26% de proteína, 4% de cinza, 29% de nifext. O autor indica que esta semente apresenta também vários minerais, especialmente potássio, cálcio, magnésio e zinco, além de açúcares como a glicose. Deve ser considerado que, as quantidades dos diferentes componentes da linhaça dependem de fatores como, a variedade, condições

de crescimento e processamento da semente, métodos analíticos usados para avaliar a composição da semente, entre outros.

5.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE DA LINHAÇA

Segundo RICKARD e THOMPSON (1997), a semente de linhaça é a fonte com maior quantidade de ácido α -linolênico, LNA (> 50% dos ácidos graxos presentes na fração lipídica). O alto grau de insaturação deste ácido graxo, o torna suscetível à ação das espécies reativas do oxigênio e dos radicais livres (DE LA TORRE e LÓPEZ, 1997). Portanto, considerando este aspecto, foi necessário realizar um estudo de estabilidade na semente de linhaça. Além disso, foi tomado em conta que a oxidação também pode ocorrer mediante atuação das enzimas lipídicas, sendo portanto necessário a inativação das mesmas, através de um branqueamento.

5.2.1 Determinação do perfil de ácidos graxos

A Tabela 8 expressa as porcentagens de área dos perfis dos ácidos graxos da semente de linhaça, submetida a um estudo de estabilidade por um período de 46 dias, utilizando como controle uma amostra com 0 (zero) dia de estocagem. Segundo estes dados pode-se verificar a redução do LNA nas 4 amostras quando comparadas com o controle. Entre as amostras, a que apresentou maior redução do ácido graxo LNA acompanhada de aumento dos ácidos palmítico, esteárico e em maior quantidade o oléico, foi a farinha de linhaça crua e estocada a temperatura ambiente (No.1). Já a amostra cozida e armazenada a temperatura de refrigeração, teve a menor diminuição do ácido graxo LNA (No.4).

Já, para CHEN *et al.* (1994), que examinaram a estabilidade da linhaça inteira e moída submetida a um aquecimento a 178 °C por 1,5 h, o LNA teve uma diminuição de 55,1 a 51,3% na linhaça moída, mas não houve mudança na semente inteira.

Tabela 8. Perfil de ácidos graxos de óleos de linhaça obtidos de suas farinhas cruas e cozidas armazenadas durante 46 dias

	CONTROLE	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3	AMOSTRA 4
Palmítico (16:0)	6,07 ± 0,12	7,87 ± 0,10	7,27 ± 0,08	6,78 ± 0,09	6,37 ± 0,06
Palmitoléico (16:1)	0,12 ± 0,00	0,14 ± 0,02	n.d.	n.d.	n.d.
Margárico (17:0)	n.d.	n.d.	0,16 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,22 ± 0,00
Esteárico (18:0)	5,19 ± 0,06	6,64 ± 0,14	6,44 ± 0,13	5,76 ± 0,11	5,57 ± 0,11
Oléico (18:1)	19,20 ± 0,01	23,34 ± 0,40	22,28 ± 0,39	21,10 ± 0,09	20,13 ± 0,08
Linoléico (18:2)	14,00 ± 0,09	14,48 ± 0,03	14,59 ± 0,05	14,46 ± 0,04	14,54 ± 0,08
Linolênico (18:3)	54,47 ± 0,61	45,73 ** ± 0,48	47,82 ** ± 0,73	51,08 ** ± 0,60	52,40 ^{ns} ± 0,77
Eicosanóico (20:0)	0,16 ± 0,01	0,26 ± 0,07	0,22 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,02
Docosanóico (22:0)	0,17 ± 0,00	0,23 ± 0,05	0,23 ± 0,06	0,20 ± 0,04	0,19 ± 0,03
Docosaenóico (22:1)	n.d.	0,16 ± 0,00	0,23 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,15 ± 0,00
Σ SATURADOS	11,32	15,00	14,31	13,03	12,50
Σ MONOINSAT.	19,43	23,64	22,51	21,27	20,28
Σ POLINSAT.	68,46	60,22	62,41	65,54	66,94

Os óleos, controle e amostras foram extraídos da semente pelo método Soxhlet (solvente: éter etílico)

Tempo de armazenamento: controle, 0 dia e amostras, 46 dias

Amostra 1: farinha de linhaça crua armazenada a temperatura ambiente (20 °C)

Amostra 2: farinha de linhaça cozida armazenada a temperatura ambiente

Amostra 3: farinha de linhaça crua armazenada a temperatura de refrigeração (4-8 °C)

Amostra 4: farinha de linhaça cozida armazenada a temperatura de refrigeração

n.d. não detectado

^{ns} média não difere estatisticamente do controle (p>0,05)

** média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 1% (p<0,01)

5.2.2 Determinação do grau de oxidação da semente de linhaça

De acordo a Tabela 9, que mostra os resultados do teste de TBA nas amostras de linhaça submetidas ao estudo de estabilidade, pode-se observar que os valores de malonaldeído formado aumenta no decorrer do tempo de estocagem. Observa-se também que as amostras de linhaça cozidas apresentaram menor oxidação com relação a linhaça crua, tanto no armazenamento a temperatura ambiente quanto de refrigeração, até 16 dias de

estocagem. No entanto, com 46 dias, a amostra de linhaça cozida e mantida a temperatura ambiente apresentou aumento no valor de malonaldeído.

Tabela 9 . Valores de TBA da farinha de linhaça, expressos como mg de malonaldeído / Kg de amostra

	TEMPO 0	TEMPO 1 (7 dias)	TEMPO 2 (16 dias)	TEMPO 3 (46 dias)
Amostra 1	0,213 ± 0,02	0,270 ^{ns} ± 0,03 ^a	0,327 ^{ns} ± 0,05	0,353 ^{ns} ± 0,06
Amostra 2	0,145 ± 0,01	0,156 ^{ns} ± 0,04	0,280 ^{ns} ± 0,07	0,462 ^{**} ± 0,02
Amostra 3	0,213 ± 0,02	0,202 ^{ns} ± 0,02	0,356 [*] ± 0,06	0,499 ^{**} ± 0,02 ^a
Amostra 4	0,145 ± 0,01	0,078 ^{ns} ± 0,02 ^b	0,270 [*] ± 0,03	0,338 ^{**} ± 0,05 ^b

Tempo 0 (controle)

Amostra 1: farinha de linhaça crua armazenada a temperatura ambiente

Amostra 2: farinha de linhaça cozida armazenada a temperatura ambiente

Amostra 3: farinha de linhaça crua armazenada a temperatura de refrigeração

Amostra 4: farinha de linhaça cozida armazenada a temperatura de refrigeração

^{ns} média não difere estatisticamente do controle (p>0,05)

* média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 5% (p<0,05)

** média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 1% (p<0,01)

^{ab} médias na mesma coluna diferem significativamente entre si (p<0,05%)

De acordo com estes resultados pode-se sugerir que o cozimento da semente de linhaça leva à inativação das enzimas que provocam a deterioração oxidativa, melhorando assim, a sua qualidade.

Para a avaliação da estabilidade da linhaça, MALCOLMSON *et al.* (2000) utilizaram amostras moídas e armazenadas a 23 ± 2 °C por 128 dias. Eles determinaram o índice de peróxido e dienos conjugados durante o período de estocagem, sem obter diferenças significativas. Determinaram também os compostos voláteis, encontrando na linhaça níveis muito mais baixos que os reportados em outros óleos armazenados contendo menor quantidade de LNA.

5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NOS EXTRATOS DE LINHAÇA

As sementes oleaginosas com alto conteúdo de lípidos devem ser adequadamente protegidas contra a oxidação lipídica, contendo portanto um eficiente sistema antioxidante endógeno (NAMIKI, 1990).

A Tabela 10 apresenta as porcentagens de inibição da oxidação tanto do extrato alcoólico quanto do aquoso de linhaça, determinados pelo sistema β -caroteno/linoléico. Pode-se observar que a fração aquosa possui maior atividade antioxidante, com relação à alcoólica. Constata-se também o efeito sinérgico quanto utilizado junto aos extratos alcoólico e aquoso, o antioxidante sintético BHT.

Tabela 10. Inibição da oxidação dos extratos da linhaça (%)

EXTRATO	BRANCO	CONTROLE BHT	AMOSTRA	BHT + AMOSTRA
Alcoólico	0	78,30	46,05	73,64
Aquoso	0	78,30	84,81	92,25

Na Tabela 11 estão apresentadas as quantidades responsáveis pela atividade antioxidante em 50 μ L de extrato. Vemos que, 451,5 μ g do extrato alcoólico é responsável por 46,05% de inibição da oxidação. Já, no extrato aquoso, 693,5 μ g é a quantidade que permite 84,81% de ação antioxidante.

Tabela 11. Concentração dos extratos alcoólico e aquoso da linhaça, responsável pela atividade antioxidante em 50 μ L de extrato

EXTRATO	MATÉRIA SECA (mg/mL)	CONCENTRAÇÃO (μ g)
Alcoólico	9,03	451,50
Aquoso	13,87	693,50

A atividade antioxidante dos extratos da linhaça, bem como do branco e do controle, pode ser visualizada na representação gráfica das diferentes leituras da absorbância vs. o tempo expressado em minutos (Figuras 16 e 17).

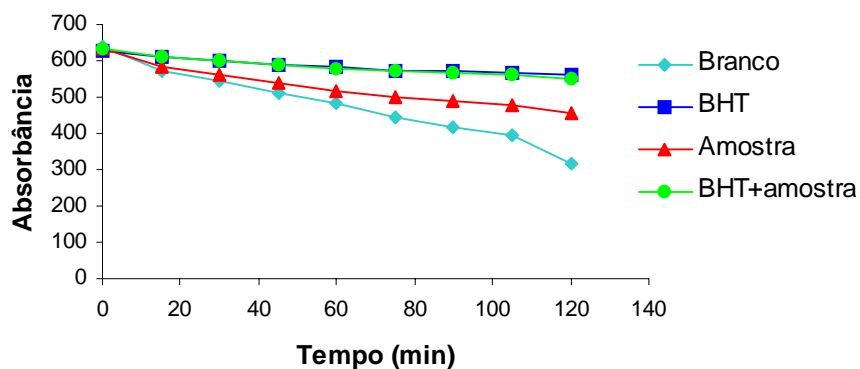


Figura 16. Atividade antioxidante da fração alcoólica da linhaça

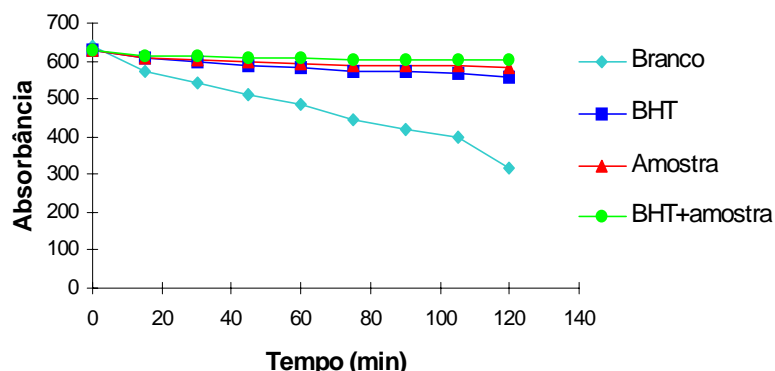


Figura 17. Atividade antioxidante da fração aquosa da linhaça

AMAROWICZ *et al.* (1993) determinaram a atividade antioxidante da linhaça utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoléico. Do extrato alcoólico da linhaça, foram separadas 4 frações, das quais a fração I foi a que apresentou maior atividade antioxidante, oferecendo 86% de proteção, quando comparada com BHA.

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NOS EXTRATOS DAS ESPECIARIAS

Dos testes realizados para determinar a porcentagem de inibição da oxidação nos diferentes extratos (alcoólico e aquoso) das especiarias, verifica-se que o extrato aquoso é o que apresenta maior atividade antioxidante, 73,78% para o orégano e 82,22% para o alecrim. Constata-se também, o efeito sinérgico quando utilizado junto com os extratos dos antioxidantes naturais, o antioxidante sintético (Tabela 12).

Na Tabela 13, estão indicadas as concentrações responsáveis pelas atividades antioxidantes em 50 μ L de extrato das especiarias, considerando a quantidade de matéria seca de cada extrato.

Tabela 12. Inibição da oxidação dos extratos alcoólico e aquoso do orégano e do alecrim (%)

EXTRATO	BRANCO	CONTROLE BHT	AMOSTRA	BHT + AMOSTRA
ALCOÓLICO				
Orégano	0	71,63	45,79	64,04
Alecrim	0	71,63	79,49	84,83
AQUOSO				
Orégano	0	67,56	73,78	69,11
Alecrim	0	67,56	82,22	78,22

Tabela 13. Concentração dos extratos alcoólico e aquoso do orégano e do alecrim, responsável pela atividade antioxidante em 50 µL de extrato

EXTRATO	MATÉRIA SECA (mg/mL)	CONCENTRAÇÃO (µg)
ALCOÓLICO		
Orégano	5,10	255,00
Alecrim	8,10	405,00
AQUOSO		
Orégano	27,40	1370,00
Alecrim	25,77	1288,50

Nas Figuras 18-21, foram representadas graficamente as atividades antioxidante dos extratos alcoólico e aquoso, tanto do orégano quanto do alecrim, relacionando os valores da absorbância medida com o tempo.

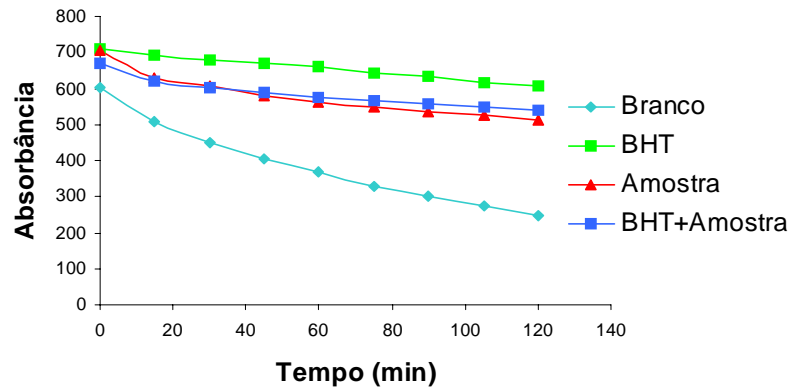


Figura 18. Atividade antioxidante da fração alcoólica do orégano

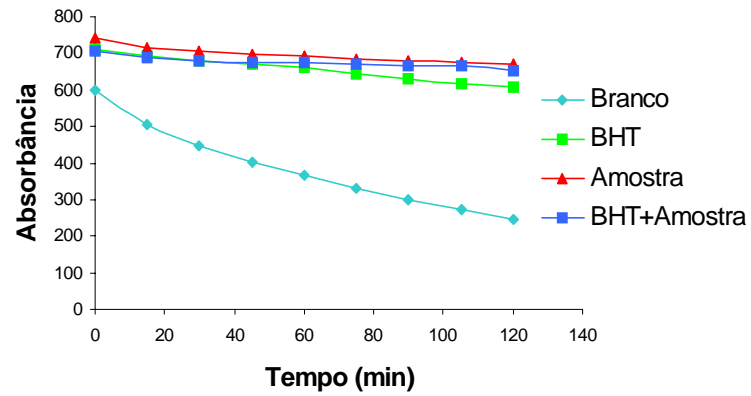


Figura 19. Atividade antioxidante da fração alcoólica do alecrim

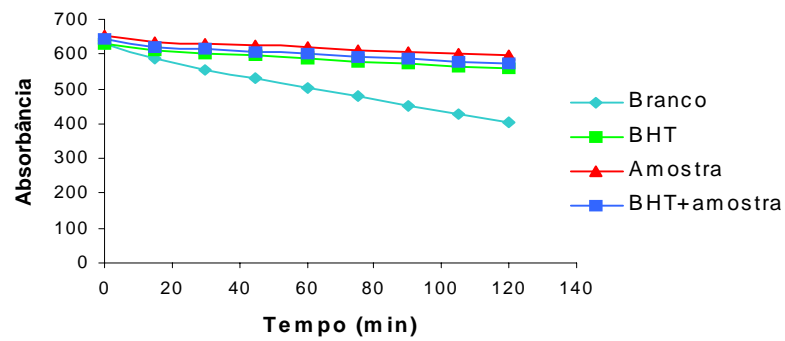


Figura 20. Atividade antioxidante da fração aquosa do orégano

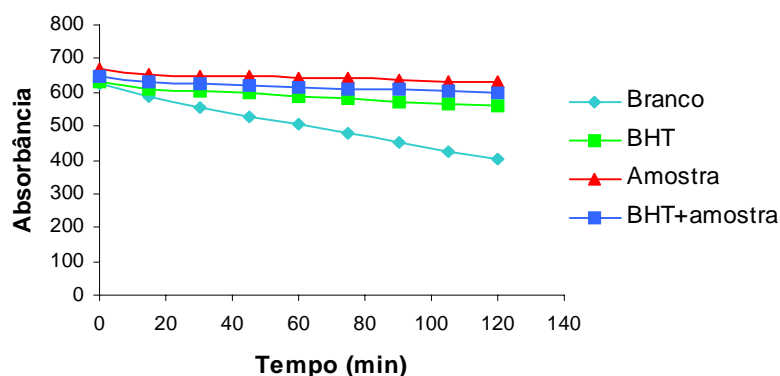


Figura 21. Atividade antioxidante da fração aquosa do alecrim

Vários estudos têm sido realizados para avaliar a atividade antioxidante de especiarias, particularmente do alecrim e do orégano. CINTRA e MANCINI FILHO (2001) estudaram extratos de orégano e alecrim *in vivo* e *in vitro*, revelando efetividade na proteção contra a oxidação.

HOULIHAN *et al.* (1984) determinaram a atividade antioxidante do rosmaridifenol, composto isolado e identificado nas folhas do alecrim, que apresentou atividade superior ao BHA quando testado o valor de peróxido em banha de porco, mantida a 60 °C, durante um período de 28 dias.

FRANKEL *et al.* (1996) determinaram a atividade antioxidante do extrato do alecrim e dos seus compostos ativos, na inibição da formação e decomposição de hidroperóxidos em sistemas oleosos (óleo de milho) e emulsões óleo-água, encontrando resultados significativos para o alecrim e os ácidos carnósico e rosmarínico. Já no óleo emulsificado, os resultados foram satisfatórios para o carnosol e o ácido carnósico.

Na determinação do período de indução em banha de porco, após adição de extratos de orégano, alecrim e outras especiarias, ECONOMOU *et al.* (1991) indicaram que o alecrim apresentou o melhor resultado, seguido pelo orégano.

Num estudo realizado por NAKATANI (1997), foi determinado que as frações polar e não-polar das folhas de orégano retardam a oxidação do ácido

linoléico, medida com tiocianeto férrico (NAKATANI e KIKUZAKI, 1987) e pelo teste do TBA.

5.5 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NA LINHAÇA E NAS ESPECIARIAS

Com o propósito de confirmar a atividade antioxidante da linhaça e das especiarias, foi realizada a identificação dos ácidos fenólicos, por cromatografia gasosa, nos extratos alcoólico e aquoso, bem como nas frações dos ácidos fenólicos livres (AFL), solúveis (AFES) e insolúveis (AFEI).

5.5.1 Ácidos fenólicos na linhaça

Para a proteção, principalmente dos lípidos das sementes, existem nas plantas constituintes que participam no mecanismo de defesa contra a oxidação, entre eles estão enzimas, carotenóides, ácido fítico, outros compostos contendo nitrogênio, bem como compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos, lignanos, tocoferóis, ubiquinonas, etc). Esses compostos são vitais para a planta, impedindo o dano causado pelo oxigênio reativo (WANASUNDARA *et al.*, 1997).

Segundo OOMAH *et al.* (1995), a semente de linhaça contém de 8 a 10 g/Kg de ácidos fenólicos totais, dos quais 5 g estão esterificados, representando de 48 a 66% dos fenólicos totais. Os autores indicam que a quantidade de ácidos fenólicos depende da estação climática e da região de crescimento da semente, mas não do cultivar, nem dos conteúdos de proteína e de óleo.

Em nosso estudo foram identificados, mediante comparação com os tempos de retenção dos padrões, os ácidos salicílico e p-hidroxibenzoico, no extrato alcoólico. No entanto, no extrato aquoso foram identificados, além dos ácidos mencionados, os ácidos fenólicos protocatequínico e gálico.

Já, a fração insolúvel (AFEI) apresentou os ácidos salicílico e p-hidroxibenzoico e a livre (AFL), além dos citados, o ácido ferúlico. A fração solúvel (AFES) é a que contém o maior número de ácidos fenólicos: salicílico, p-hidroxibenzoico, vanílico, gentísico, gálico, ferúlico e clorogênico, como mostra a Figura 22.

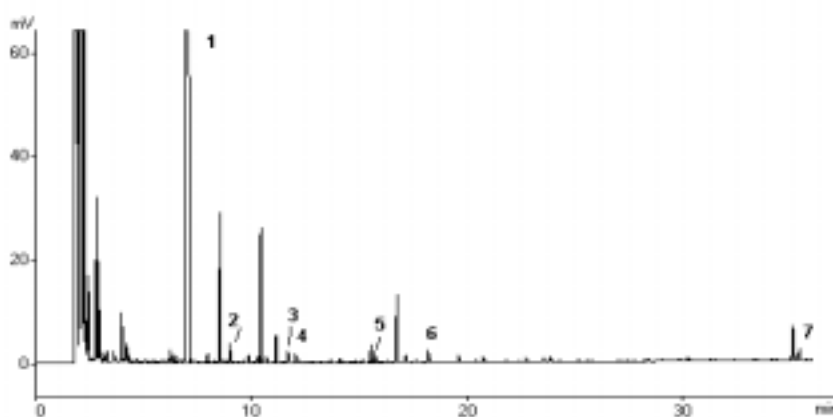


Figura 22. Ácidos fenólicos na fração AFES da linhaça (1, salicílico; 2, p-hidroxibenzoico; 3, vanílico; 4, gentísico; 5, gálico; 6, ferúlico; 7, clorogênico)

DABROWSKI e SOSULSKI (1984), determinando a composição de ácidos fenólicos em farinhas desengorduradas de sementes oleaginosas, encontraram que a linhaça contém os ácidos p-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico, trans-p-cumárico, trans-ferúlico, trans-cafeico e trans-sinápico, dos quais os que estavam em maior quantidade são o trans-ferúlico e trans-sinápico, com 37,6 e 29,1 mg/100 g de farinha, respectivamente.

5.5.2 Compostos fenólicos nas especiarias

Os ácidos fenólicos que foram identificados nas especiarias orégano e alecrim, podem ser observados na Tabela 14.

Tabela 14. Ácidos fenólicos nas diferentes frações do orégano e do alecrim

FRAÇÃO	ORÉGANO	ALECRIM
Alcoólica		quínico p-cumárico
Aquosa	p-hidroxibenzóico protocatequínico quínico	p-hidroxibenzóico protocatequínico (-) quínico p-cumárico
AFL	p-hidroxibenzóico protocatequínico ferúlico	p-hidroxibenzóico vanílico ferúlico
AFEI	p-hidroxibenzóico protocatequínico ferúlico caféico	p-hidroxibenzóico ferúlico
AFES	p-hidroxibenzóico protocatequínico quínico (-) quínico caféico clorogênico	p-hidroxibenzóico vanílico p-cumárico ferúlico caféico

Nas Figuras 23 e 24 podem ser observados os ácidos fenólicos da fração solúvel (AFES), tanto do orégano quanto do alecrim, sendo esta a amostra mais representativa. Portanto foi confirmada nesta fração a presença dos ácidos fenólicos, através de cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (Anexos 3 e 4).

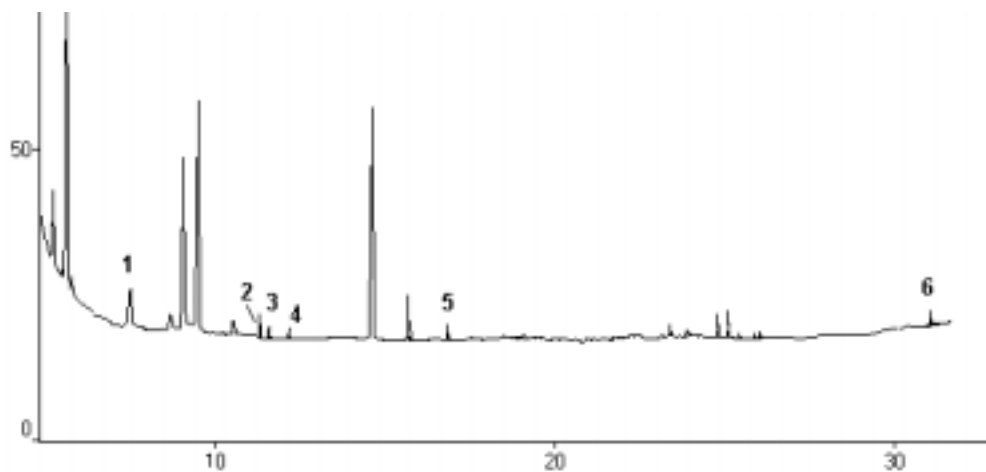


Figura 23. Ácidos fenólicos na fração solúvel (AFES) do orégano (1, p-hidroxibenzóico; 2, protocatequínico; 3, quínico; 4, (-)quínico; 5, caféico; 6, clorogênico)

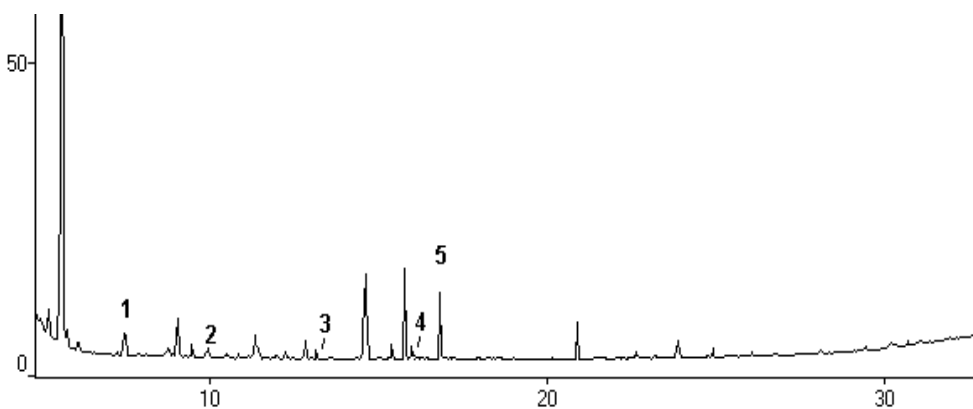


Figura 24. Ácidos fenólicos na fração solúvel (AFES) do alecrim (1, p-hidroxibenzóico; 2, vanílico; 3, p-cumárico; 4, ferúlico; 5, caféico)

Para PRATT (1992), a atividade antioxidante do alecrim depende principalmente da concentração dos ácidos carnósico e rosmarínico, sendo este último derivado do ácido caféico. Para NAKATANI (1997), os ácidos fenólicos carboxílicos são muito comuns na família *Labiatae*, apresentando o orégano os ácidos protocatequínico e caféico.

Muitas fontes de antioxidantes naturais tem sido descobertas nos últimos anos. Para os autores SHAHIDI e WANASUNDARA (1992), torna-se necessária a identificação dos seus compostos ativos, além de serem realizados estudos toxicológicos para sua utilização. Para o desenvolvimento de antioxidantes de origem natural com atividade comparável ao BHA, deve levar-se em conta aspectos como a variedade do alimento, estabilidade, solubilidade, elaboração e custo (NAMIKI, 1990).

As técnicas cromatográficas preparativas e analíticas têm permitido identificar compostos antioxidantes muito interessantes, não somente nas especiarias tradicionais, bem como em ervas aromáticas, entre elas o alecrim e o orégano. Estes compostos são de natureza fenólica, o que explica seu poder antioxidante. Destes compostos, talvez o maior interesse esteja direcionado ao ácido rosmarínico, sendo este muito mais potente que o BHA e o BHT. Atualmente, são comercializados os extratos de alecrim, dispersáveis em óleo, em água ou como sinérgicos para serem combinados com o tocoferol (DE LA TORRE e LÓPEZ, 1997).

5.6 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DAS RAÇÕES

Para nosso estudo foram preparadas 3 formulações isoprotéicas e isocalóricas, cuja composição centesimal está indicada na Tabela 15. O perfil de ácidos graxos correspondente à fração lipídica extraída das diferentes rações está expresso na Tabela 16, verificando-se maior concentração do ácido α -linolênico nas formulações com 5 e 10 % de óleo de linhaça.

Tabela 15. Composição centesimal das rações (g / 100 g de amostra)

	FORMULAÇÃO I 0% óleo linhaça	FORMULAÇÃO II 5% óleo linhaça	FORMULAÇÃO III 10% óleo linhaça
Umidade	10,17 \pm 0,10	9,72 \pm 0,09	9,47 \pm 0,09
Lípides	6,71 \pm 0,12	8,34 \pm 0,14	11,07 \pm 0,05
Proteínas	14,36 \pm 0,18	13,63 \pm 0,15	13,27 \pm 0,60
Cinza	11,15 \pm 1,20	10,56 \pm 0,75	11,31 \pm 0,36
Nifext	57,61	57,75	54,88

Tabela 16. Perfil de ácidos graxos da fração lipídica das rações (% de área)

	FORMULAÇÃO I	FORMULAÇÃO II	FORMULAÇÃO III
Palmítico (16:0)	12,06 ± 0,01	8,67 ± 0,07	7,00 ± 0,16
Palmitoléico (16:1)	0,11 ± 0,01	n.d.	0,14 ± 0,00
Estearico (18:0)	2,00 ± 0,01	3,61 ± 0,04	4,32 ± 0,05
Oléico (18:1)	34,46 ± 0,04	25,16 ± 0,20	21,14 ± 1,05
Linoléico (18:2)	48,62 ± 0,11	27,86 ± 0,35	17,06 ± 0,05
α-Linolênico (18:3)	1,20 ± 0,01	32,52 ± 0,54	48,68 ± 0,54
Eicosanóico (20:0)	0,44 ± 0,01	0,40 ± 0,19	0,20 ± 0,02
Eicosaenóico (20:1)	0,33 ± 0,00	0,30 ± 0,20	0,19 ± 0,01
Docosanóico (22:0)	0,19 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,14 ± 0,00
Docosaenóico (22:1)	0,10 ± 0,02	n.d.	0,11 ± 0,01
Tetracosanóico (24:0)	0,18 ± 0,00	0,16 ± 0,02	0,10 ± 0,01
Docosahexaenóico (22:6)	n.d.	n.d.	0,16 ± 0,01
Σ SATURADOS	14,87	13,00	11,76
Σ MONOINSAT.	35,00	25,46	21,58
Σ POLINSAT.	49,82	60,38	65,90

n.d. não detectado

5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS RAÇÕES

Após preparação das rações, foi verificada a presença de atividade antioxidante nas mesmas. Pode-se constatar, na Tabela 17, que os extratos dos diferentes tratamentos que foram suplementados com antioxidantes sintéticos e naturais, apresentaram uma atividade antioxidante maior quando comparados com seu respectivo controle. O que indica que houve incorporação dos antioxidantes tanto sintéticos quanto naturais e que estariam exercendo a sua ação de proteção contra a oxidação. Na tabela também consta a

concentração responsável pela atividade antioxidante, para todos os tratamentos.

Tabela 17. Porcentagem de inibição da oxidação nas rações (8 tratamentos)

TRATAMENTO	BHT	AMOSTRA	BHT + AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (μg)
Controle 0%				
linhaça	86,88	49,44 \pm 4,85	82,70 \pm 0,42	247
BHA+BHT	87,00	69,32 \pm 0,63	87,60 \pm 1,94	237
Orégano	92,83	57,57 \pm 4,74	90,98 \pm 0,98	247
Alecrim	92,83	55,03 \pm 4,09	89,13 \pm 0,33	220
Controle 5%				
linhaça	94,23	45,52 \pm 0,60	87,71 \pm 0,45	380
BHA+BHT	86,63	71,46 \pm 0,84	81,85 \pm 2,03	340
Orégano	93,62	53,08 \pm 1,51	88,18 \pm 1,67	307
Alecrim	81,80	51,34 \pm 1,12	77,45 \pm 1,12	280

Cabe mencionar que o planejamento do experimento em relação à quantidade de semente de linhaça nas dietas foi delineado de acordo à literatura, na qual encontrou-se discrepância quando relacionadas concentração de linhaça e produção de ovos. Assim, CASTON *et al.* (1994) trabalharam com concentrações de 10 e 20% de semente de linhaça moída durante 28 dias, sem ter afetado a produção de ovos e peso das gemas. FERRIER *et al.* (1995) utilizaram dietas contendo também 10 e 20% de linhaça moída na alimentação das aves, sem mencionar alteração com relação à produção dos ovos. CHERIAM e SIM (1991) realizaram um estudo com dietas de 8 e 16% de semente de linhaça durante 3 semanas e determinaram incorporação significativa dos ácidos graxos ômega 3 nas gemas de ovo nas duas dietas. O trabalho de AYMOND e VAN ELSWYK (1995) foi realizado com dietas com 5 e 15% de semente de linhaça durante 5 semanas, havendo redução no consumo da ração com 15% de linhaça e portanto diminuição na produção de ovos a partir da segunda semana de alimentação das aves. Já,

FARRELL (1997) testando uma dieta com 15% de semente de linhaça por 5 semanas, encontrou redução significativa na produção de ovos.

Em nosso experimento, as aves que foram alimentadas com a ração contendo 10% de óleo de linhaça, aos poucos dias de iniciado o experimento, apresentaram um quadro de desarranjo intestinal começando a rejeitar a ração, portanto, a produção de ovos diminuiu notavelmente. Por esse motivo, o nosso estudo foi conduzido somente com as duas formulações restantes, 0 e 5% de óleo de linhaça.

5.8 ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA 3 NAS GEMAS DE OVO

5.8.1 Incorporação do ácido α -linolênico (LNA)

Segundo os dados observados na Tabela 18, verificaram-se diferenças estatísticas ($p < 0,001$) nas dietas com 5% de óleo de linhaça, nos tratamentos controle, BHA+BHT, orégano e alecrim, nos diferentes tempos (10, 20 e 30 dias) quando comparados com as dietas 0% de linhaça. Isto indica que houve incorporação do LNA das gemas de ovo. Também pode ser observado nos tratamentos com 5% de óleo de linhaça, a incorporação deste ácido nas gemas aparece já aos 10 dias de alimentação das aves. Além disso, observou-se um aumento pequeno na quantidade de LNA no tempo 20 dias com relação a 10 dias nos 4 tratamentos, encontrando-se diferença significativa nos tratamentos orégano e alecrim. Já no tempo 30, a quantidade de LNA foi menor com relação ao tempo 20. Relacionando os tempos 10 e 30 dias, verificou-se aumento do LNA nas 4 dietas, com diferença estatística no alecrim. Deste estudo, podemos indicar que a incorporação máxima do ácido α -linolênico nas gemas de ovo foi obtida aos 20 dias de alimentação das aves (Figura 25).

Cabe mencionar que os tratamentos com 0% de óleo de linhaça no tempo 0 (zero) dia apresentam uma quantidade do LNA maior que nos outros tempos, isto deve-se a que no começo do experimento, os ovos corresponderam às galinhas alimentadas com uma ração comercial.

Tabela 18. Incorporação do ácido α -linolênico (LNA) nas gemas de ovo, em 4 períodos de tempo, expresso como mg de ácido / g de gema

	TEMPO 0	TEMPO 10	TEMPO 20	TEMPO 30
CONTROLE				
0% LINHAÇA	1,22 \pm 0,07	0,34 \pm 0,11	0,43 \pm 0,10	0,38 \pm 0,03
5% LINHAÇA	1,14 ^{ns} \pm 0,13	5,57 ^{***} \pm 0,66 ^a	6,48 ^{***} \pm 0,37 ^a	6,36 ^{***} \pm 0,53 ^a
BHA+BHT				
0% LINHAÇA	0,71 \pm 0,11	0,25 \pm 0,05	0,31 \pm 0,07	0,25 \pm 0,03
5% LINHAÇA	1,01 ^{**} \pm 0,08	5,69 ^{***} \pm 0,47 ^a	6,34 ^{***} \pm 0,48 ^a	5,72 ^{***} \pm 0,49 ^a
ORÉGANO				
0% LINHAÇA	0,99 \pm 0,15	0,31 \pm 0,02	0,27 \pm 0,03	0,29 \pm 0,06
5% LINHAÇA	1,11 ^{ns} \pm 0,16	5,92 ^{***} \pm 0,36 ^a	7,34 ^{***} \pm 0,43 ^b	6,32 ^{***} \pm 0,37 ^{ab}
ALECRIM				
0% LINHAÇA	0,96 \pm 0,08	0,34 \pm 0,09	0,34 \pm 0,09	0,22 \pm 0,02
5% LINHAÇA	1,13 ^{ns} \pm 0,22	5,61 ^{***} \pm 0,67 ^a	6,77 ^{***} \pm 0,33 ^b	6,84 ^{***} \pm 0,20 ^b

n.s. média não difere estatisticamente entre as dietas (0 e 5% de linhaça) para cada tempo, ($p > 0,05$)

** média difere estatisticamente entre as dietas (0 e 5% de linhaça) para cada tempo, ao nível de erro de 1% ($p < 0,01$)

*** média difere estatisticamente entre as dietas (0 e 5% de linhaça) para cada tempo, ao nível de erro de 0,1% ($p < 0,001$)

^{a b} letras diferentes na mesma linha (dieta 5% linhaça), quando relacionados os tempos 10, 20 e 30 dias, difere estatisticamente ($p < 0,05$)

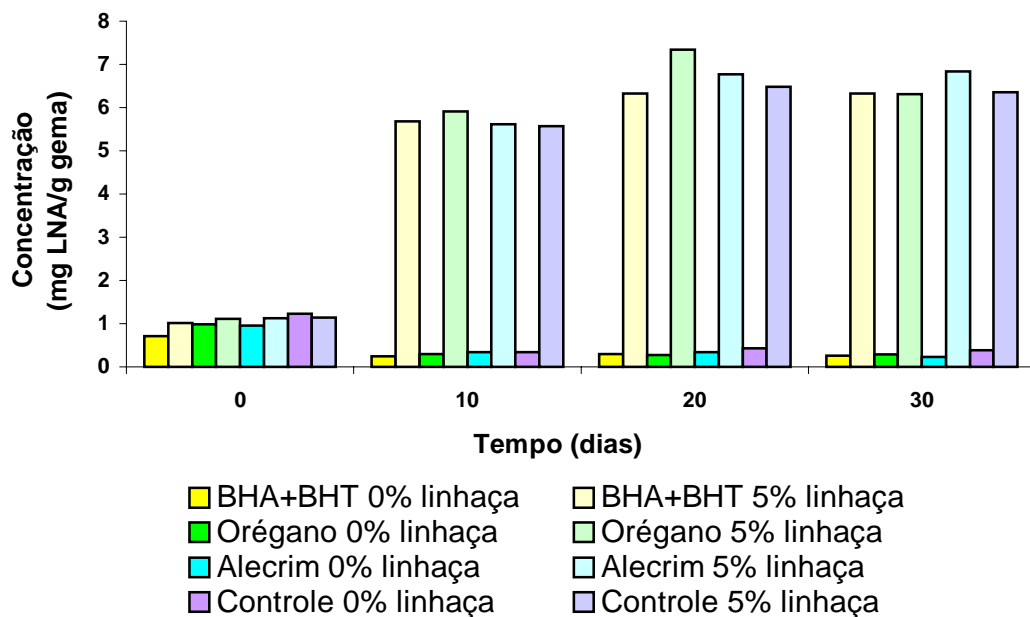


Figura 25. Incorporação de LNA nas gemas de ovo nos tratamentos com 0 e 5% de óleo de linhaça

Muitos estudos têm sido elaborados com o objetivo de aumentar o teor de ácidos graxos polinsaturados ω -3 em ovos, através da manipulação nutricional das dietas de galinhas poedeiras, usando óleos marinhos e/ou sementes oleaginosas. Desta maneira, CASTON e LEESON (1990) trabalharam com dietas de 0, 10, 20 e 30% de semente de linhaça para verificar a influência destas dietas sobre as gemas de ovo. Os autores encontraram um aumento significativo de LNA em todos os níveis, embora a dieta com 20% foi mais efetiva. Verificaram também que com a dieta de 10%, os ovos resultaram em um aumento superior a 10 vezes quando comparados com os ovos não enriquecidos. FERRIER et al. (1995) trabalharam com 10 e 20% de semente de linhaça, encontrando nestes ovos modificados 261 e 527 mg/ovo de LNA, respectivamente, sendo estes valores significativos com relação ao controle com 28 mg/ovo. Já, VAN ELSWYK (1997), estudando a influência da forma da linhaça (semente inteira ou moída) encontrou que

fornecendo uma dieta com 15% de linhaça moída, leva a uma incorporação de 24 mg de PUFA ω -3 totais em 1g de gema, no entanto, com a semente de linhaça inteira a quantidade foi significativamente menor (18 mg/g de gema).

Em nosso estudo foi verificada a incorporação do LNA em ovos mediante a suplementação das rações das aves com semente de linhaça moída. O acréscimo deste ácido graxo foi de 15 a 30 vezes nas gemas dos ovos enriquecidos com 5% de óleo de linhaça; este resultado está em conformidade com LEWIS *et al.* (2000), que incorporando 7% de óleo de linhaça a uma dieta comercial controle, encontraram que os PUFA ω -3 aumentaram de 1,2% a 7,8% na gema de ovo, constatando que o LNA teve um aumento de 30 vezes.

5.8.2 Incorporação do ácido docosahexaenóico (DHA)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 19, pode-se verificar que nos tratamentos com 5% de linhaça nos 3 tempos (10, 20 e 30 dias), houve um aumento considerável ($p < 0,001$) da quantidade do DHA quando comparados com a dieta 0% de óleo de linhaça e também quando comparados com o tempo 0 (zero) dia, sendo este acréscimo observado após 10 dias de administração da ração. Os ovos provenientes das galinhas que receberam ração com 5% de linhaça e antioxidantes sintéticos e naturais durante 20 dias, apresentaram teores ainda maiores de DHA, obtendo portanto neste tempo, a maior incorporação do ácido graxo (Figura 26). Os autores, CHERIAM e SIM (1991), num estudo realizado com galinhas poedeiras alimentadas com 8 e 16% de linhaça, observaram que a quantidade máxima de PUFA ω -3 incorporada na gema de ovo ocorreu após 15 dias de experimento.

O aumento na quantidade do ácido graxo de cadeia longa (DHA) ocorrido na fração lipídica das gemas dos ovos de nosso experimento, teve uma taxa de incorporação que vai de 2,5 a 4,5, assim, como encontrado por LEWIS *et al.* (2000), num estudo realizado com 7% de óleo de linhaça, que observaram um acréscimo de DHA de 4 vezes, quando comparado com o controle.

Tabela 19. Incorporação do ácido docosahexaenóico (DHA) nas gemas de ovo, em 4 períodos de tempo, expresso como mg de ácido / g de gema

	TEMPO 0	TEMPO 10	TEMPO 20	TEMPO 30
CONTROLE				
0% LINHAÇA	5,00 ± 0,37	2,63 ± 0,41	3,17 ± 0,46	3,21 ± 0,30
5% LINHAÇA	4,76 ^{ns} ± 0,44	9,16 ^{***} ± 0,42 ^a	8,28 ^{***} ± 0,46 ^b	7,36 ^{***} ± 0,17 ^c
BHA+BHT				
0% LINHAÇA	3,99 ± 0,45	1,85 ± 0,20	1,73 ± 0,21	1,79 ± 0,21
5% LINHAÇA	4,62 [*] ± 0,37	7,57 ^{***} ± 0,42 ^a	7,87 ^{***} ± 0,63 ^a	8,07 ^{***} ± 0,15 ^a
ORÉGANO				
0% LINHAÇA	4,62 ± 0,47	2,53 ± 0,16	1,87 ± 0,19	2,24 ± 0,46
5% LINHAÇA	4,60 ^{ns} ± 0,35	7,43 ^{***} ± 0,35 ^a	7,70 ^{***} ± 0,43 ^a	6,34 ^{***} ± 0,23 ^b
ALECRIM				
0% LINHAÇA	4,69 ± 0,44	3,29 ± 0,35	2,05 ± 0,39	2,01 ± 0,43
5% LINHAÇA	4,36 ^{ns} ± 0,37	8,18 ^{***} ± 0,33	8,73 ^{***} ± 0,38 ^a	7,66 ^{***} ± 0,49 ^b

^{n.s.} média não difere estatisticamente entre as dietas (0 e 5% de linhaça) para cada tempo, (p>0,05)

^{*} média difere estatisticamente entre as dietas (0 e 5% de linhaça) para cada tempo, ao nível de erro de 5% (p<0,05)

^{***} média difere estatisticamente entre as dietas (0 e 5% de linhaça) para cada tempo, ao nível de erro de 0,1% (p<0,001)

^{a b c} letras diferentes na mesma linha (dieta 5% linhaça), quando relacionados os tempos 10, 20 e 30 dias, difere estatisticamente (p<0,05%)

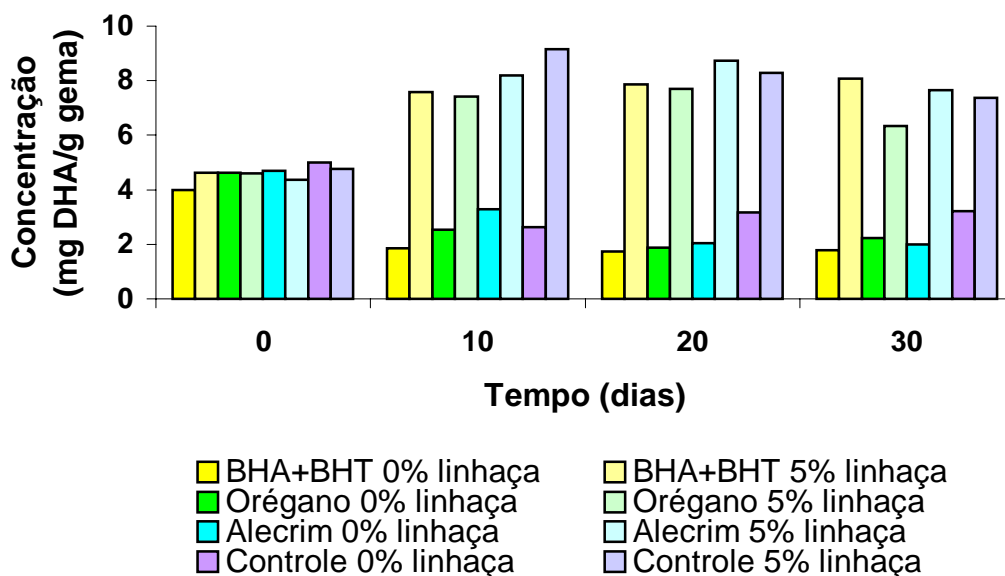


Figura 26. Incorporação de DHA nas gemas de ovo nos tratamentos com 0 e 5% de óleo de linhaça

Considerando a importância nutricional dos PUFA de cadeia longa, EPA e DHA na saúde humana, é interessante destacar a incorporação do DHA nas gemas de ovo através de dietas suplementadas com linhaça. Assim, num estudo realizado por BAUCCELLS *et al.* (2000), que experimentaram dietas com diferentes proporções de óleos de peixe e de linhaça, encontraram que a quantidade dos PUFA ω -3 de cadeia longa (EPA e DHA) nos diferentes tratamentos foi significativamente menor quando o óleo de peixe esteve presente na dieta em menores proporções. A substituição total do óleo de peixe pelo de linhaça resultou no declínio mais baixo destes ácidos graxos e num aumento no total dos PUFA ω -3 na forma de LNA. Quando utilizaram, além da linhaça, outras fontes de lípides (óleos de colza, girassol e sebo) para substituir o óleo de peixe, encontraram que os valores mais altos desses ácidos graxos de cadeia longa na gema de ovo, foram observados na dieta com linhaça. Desta maneira, quando o DHA não é fornecido diretamente através da dieta, o

LNA, presente em alta quantidade na linhaça, torna-se o ácido graxo precursor dos ácidos graxos DHA e EPA.

5.9 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO NAS GEMAS DE OVO

Sabe-se que os ácidos graxos polinsaturados, pelo fato de possuírem várias duplas ligações, são suscetíveis à oxidação, portanto, as gemas de ovo enriquecidas com os mesmos, tornam-se também suscetíveis à deterioração lipídica, sendo necessário a proteção mediante o uso de antioxidantes. O grau de oxidação das gemas e a eficácia do uso destes antioxidantes foram avaliados através da determinação do teste de TBA.

Os resultados deste teste (Tabela 20), para o tratamento com 0% de óleo de linhaça, revelaram diminuição dos valores de absorbância tanto nos antioxidantes sintéticos quanto nos naturais, nos tempos 10, 20 e 30 dias com relação ao seu respectivo controle, sendo esta diferença significativa. Para o tratamento com 5% de óleo de linhaça, verificou-se diferença significativa ($p < 0,001$) na redução dos valores de absorbância nos tempos 20 e 30 dias, para os 3 antioxidantes, como também para o BHA+BHT no tempo 10 dias. É necessário destacar que nos grupos controle houve aumento no valor da absorbância no decorrer do tempo, no entanto, nos tratamentos com antioxidantes esta característica foi inversa. Observou-se também que no tempo 0 (zero) nas 2 dietas (0 e 5% de óleo de linhaça) para todos os antioxidantes, os valores de absorbância foram mais altos que o controle.

É importante destacar que os valores de absorbância de todos os tratamentos da dieta com 5% de óleo de linhaça nos diferentes tempos, foram maiores quando comparados com os tratamentos com 0% de linhaça. Estes resultados sugerem que o maior número de insaturação do ALN presente na linhaça, provocou um maior grau de oxidação.

Em geral, nas 2 dietas (0 e 5% de óleo de linhaça), nos 3 períodos de tempo a presença dos antioxidantes naturais e sintéticos mostrou uma proteção considerável contra a oxidação lipídica, comprovando-se assim, o seu

efeito antioxidante no modelo experimental utilizado neste trabalho, (Figuras 27 e 28).

Tabela 20. Teste de TBA nas gemas de ovo, (valores médios de absorvância dos tratamentos com 0 e 5% de óleo de linhaça com seu respectivo controle, sem antioxidante, nos 4 períodos de tempo)

0% ÓLEO LINHAÇA	TEMPO 0	TEMPO 10	TEMPO 20	TEMPO 30
CONTROLE	0,1541 ± 0,00	0,1745 ± 0,01	0,1756 ± 0,01	0,1712 ± 0,01
BHA + BHT	0,1683*** ± 0,00	0,1437*** ± 0,00	0,1507* ± 0,02	0,1283*** ± 0,01
ORÉGANO	0,1703*** ± 0,00	0,1503*** ± 0,01	0,1541* ± 0,01	0,1387*** ± 0,01
ALECRIM	0,1762*** ± 0,01	0,1554** ± 0,01	0,1566 ^{ns} ± 0,01	0,1395 *** ± 0,02
5% ÓLEO LINHAÇA	TEMPO 0	TEMPO 10	TEMPO 20	TEMPO 30
CONTROLE	0,1630 ± 0,00	0,1782 ± 0,00	0,1903 ± 0,01	0,2007 ± 0,01
BHA + BHT	0,1762** ± 0,01	0,1677*** ± 0,00	0,1698*** ± 0,01	0,1679*** ± 0,00
ORÉGANO	0,1776*** ± 0,00	0,1823 ^{ns} ± 0,00	0,1551*** ± 0,01	0,1803** ± 0,01
ALECRIM	0,1716 ^{ns} ± 0,01	0,1795 ^{ns} ± 0,00	0,1580*** ± 0,01	0,1712*** ± 0,01

ns Média não difere estatisticamente do controle 0 (zero) dia ($p > 0,05$)

* Média difere estatisticamente do controle 0 dia ao nível de erro de 5% ($p < 0,05$)

** Média difere estatisticamente do controle 0 dia ao nível de erro de 1% ($p < 0,01$)

*** Média difere estatisticamente do controle 0 dia ao nível de erro de 0,1% ($p < 0,001$)

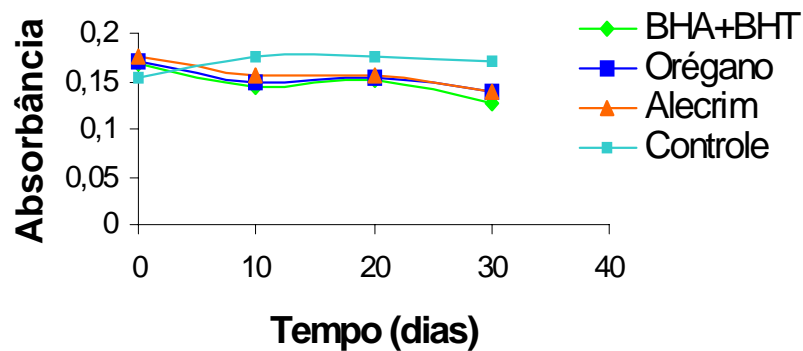


Figura 27. Teste de TBA nas gemas de ovo, (valores de absorbância vs. tempo) dos tratamentos com 0% de óleo de linhaça e seu respectivo controle

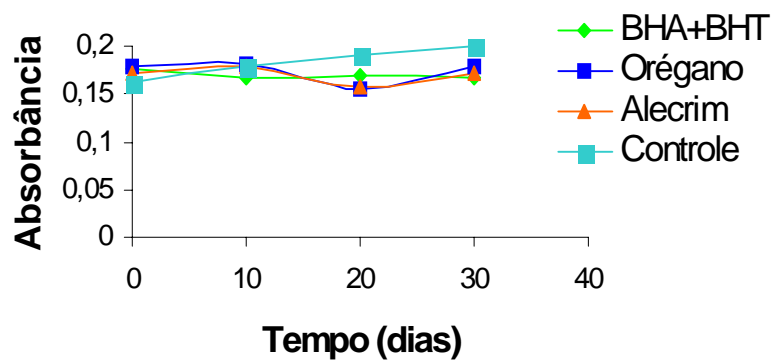


Figura 28. Teste de TBA nas gemas de ovo, (valores de absorbância vs. tempo) dos tratamentos com 5% de óleo de linhaça e seu respectivo controle

No estudo realizado por AYMOND e VAN ELSWYK (1995), foram determinados os valores de TBARS expressos em mg de TBARS / Kg de gema. Foram testados ovos enriquecidos com PUFA ω -3 através de dietas suplementadas com 5 e 15% de semente de linhaça inteira e moída durante 5 semanas. Neste ensaio não foi encontrada diferença significativa entre os valores de TBARS dos tratamentos (0,20-0,23 mg/Kg de gema) em relação ao controle (0,18 mg/Kg de gema). Contudo, em nosso trabalho encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos com 0 e 5% de óleo de linhaça, revelando portanto, que a peroxidação lipídica ocorreu pela presença da maior quantidade de ácidos graxos polinsaturados.

Para QI e SIM (1998) a utilização de tocoferol natural (0, 200, 400 e 800 mg/Kg de dieta) em dietas suplementadas com 15% de linhaça e 0,5% de óleo de peixe, conduziu à redução significativa dos valores de TBARS de 41,32 a 18,57 nmol de malonaldeído / g de gema. Esta proteção contra a oxidação, por parte do antioxidante, observada pelos mencionados autores, apoiam nossos resultados, os quais sugerem que a estabilidade lipídica dos ovos enriquecidos com PUFA ω -3 pode ser melhorada pela incorporação de antioxidantes, tanto sintéticos quanto naturais.

5.10 TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS GEMAS DE OVO

5.10.1 Ácidos graxos ômega 3

5.10.1.1 Ácido α -linolênico (LNA, C18:3)

De acordo com a Tabela 21, onde estão expressas as concentrações de LNA das gemas de ovo dos 4 tempos de alimentação das aves, submetidas ao tempo de armazenamento de 40 dias, constata-se que na dieta com 5% de óleo de linhaça com 10 dias de alimentação, nos tempos 20 e 40 dias, houve um aumento não significativo do LNA nos tratamentos com orégano e alecrim quando comparados com o respectivo controle. Já, no tempo 20 dias de alimentação, o aumento do ácido graxo foi observado nos 4 períodos de tempo para todos os antioxidantes, sendo esta diferença significativa somente para o orégano e o alecrim, nos tempos 10 e 20 dias de estabilidade, mostrando a capacidade protetora destes antioxidantes naturais contra a oxidação lipídica no decorrer do tempo. Para 30 dias de alimentação, este aumento ocorreu somente no tratamento com orégano, no entanto, para os outros tratamentos houve redução na quantidade de LNA, sendo esta, não significativa.

Foi observado também que na dieta 0% de óleo linhaça, nos 4 tempos de alimentação e nos 4 tempos de estabilidade, os tratamentos com antioxidantes apresentaram menores quantidades de LNA com relação ao controle.

Tabela 21. Determinação do ácido α -linolênico (LNA, C18:3) nas gemas de ovo, expresso como mg de ácido / g de gema

TEMPO 0 DIA ALIMENTAÇÃO				
TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS GEMAS (dias)				
TRATAMENTO	0	10	20	40
Controle 0% linhaça	1,36 ± 0,02	1,31 ± 0,04	1,30 ± 0,04	1,30 ± 0,08
BHA+BHT	0,84 ± 0,02	0,99 ± 0,07	0,97 ± 0,03	0,93 ± 0,04
Orégano	1,04 ± 0,03	1,04 ± 0,04	1,00 ± 0,01	1,01 ± 0,05
Alecrim	1,08 ± 0,02	1,18 ± 0,00	1,14 ± 0,03	1,13 ± 0,05
Controle 5% linhaça	1,62 ± 0,11	1,66 ± 0,05	1,68 ± 0,04	1,56 ± 0,03
BHA+BHT	1,24 ± 0,11	1,43 ± 0,13	1,36 ± 0,03	1,29 ± 0,04
Orégano	1,26 ± 0,04	1,46 ± 0,10	1,48 ± 0,10	1,36 ± 0,05
Alecrim	1,40 ± 0,15	1,69 ± 0,19	1,47 ± 0,05	1,46 ± 0,06
TEMPO 10 DIAS ALIMENTAÇÃO				
TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS GEMAS (dias)				
TRATAMENTO	0	10	20	40
Controle 0% linhaça	0,45 ± 0,03	0,51 ± 0,05	0,61 ± 0,09	0,53 ± 0,01
BHA+BHT	0,28 ± 0,04	0,30 ± 0,05	0,32 ± 0,00	0,31 ± 0,01
Orégano	0,33 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,38 ± 0,02
Alecrim	0,47 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,44 ± 0,03	0,49 ± 0,01
Controle 5% linhaça	6,92 ± 0,33	7,60 ± 0,09	6,99 ± 0,18	7,43 ± 0,13
BHA+BHT	6,35 ^{ns} ± 0,28	6,66 ^{**} ± 0,24	6,17 ^{**} ± 0,25	6,72 [*] ± 0,15
Orégano	7,06 ^{ns} ± 0,14	7,23 ^{ns} ± 0,22	7,01 ^{ns} ± 0,01	7,66 ^{ns} ± 0,45
Alecrim	6,64 ^{ns} ± 0,55	7,45 ^{ns} ± 0,35	7,35 ^{ns} ± 0,15	7,57 ^{ns} ± 0,08

Tabela 21. (Cont.)

TEMPO 20 DIAS ALIMENTAÇÃO				
TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS GEMAS (dias)				
TRATAMENTO	0	10	20	40
Controle 0% linhaça	0,40 ± 0,02	0,45 ± 0,00	0,46 ± 0,01	0,46 ± 0,02
BHA+BHT	0,26 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,29 ± 0,02
Orégano	0,31 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,31 ± 0,01
Alecrim	0,35 ± 0,01	0,45 ± 0,04	0,42 ± 0,01	0,41 ± 0,01
Controle 5% linhaça	6,98 ± 0,16	7,35 ± 0,18	7,43 ± 0,24	6,83 ± 0,19
BHA+BHT	7,47 ^{ns} ± 0,55	7,62 ^{ns} ± 0,10	7,58 ^{ns} ± 0,22	6,99 ^{ns} ± 0,57
Orégano	7,15 ^{ns} ± 0,18	7,91 [*] ± 0,35	8,11 ^{**} ± 0,15	7,26 ^{ns} ± 0,18
Alecrim	7,09 ^{ns} ± 0,41	8,19 ^{**} ± 0,08	8,15 ^{**} ± 0,10	7,64 ^{ns} ± 0,28
TEMPO 30 DIAS ALIMENTAÇÃO				
TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS GEMAS (dias)				
TRATAMENTO	0	10	20	40
Controle 0% linhaça	0,47 ± 0,01	0,54 ± 0,02	0,50 ± 0,02	0,49 ± 0,06
BHA+BHT	0,31 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,33 ± 0,03
Orégano	0,29 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,31 ± 0,00	0,32 ± 0,02
Alecrim	0,37 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,39 ± 0,01
Controle 5% linhaça	6,82 ± 0,13	7,93 ± 0,04	7,24 ± 0,21	7,53 ± 0,28
BHA+BHT	6,83 ^{ns} ± 0,30	7,83 ^{ns} ± 0,33	6,96 ^{ns} ± 0,05	7,26 ^{ns} ± 0,08
Orégano	7,28 ^{ns} ± 0,13	8,25 ^{ns} ± 0,12	7,32 ^{ns} ± 0,29	7,59 ^{ns} ± 0,37
Alecrim	6,52 ^{ns} ± 0,25	7,21 [*] ± 0,37	6,95 ^{ns} ± 0,57	7,19 ^{ns} ± 0,33

^{ns} Média não difere estatisticamente do controle 5% linhaça (p>0,05)

^{*} Média difere estatisticamente do controle 5% linhaça ao nível de erro de 5% (p<0,05)

^{**} Média difere estatisticamente do controle 5% linhaça ao nível de erro de 1% (p<0,01)

5.10.1.2 Ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6)

Considerando os dados apresentados na Tabela 22, que mostra o tempo de armazenamento das gemas de ovo durante 40 dias, relacionando a quantidade do DHA, pode-se observar uma relativa proteção por parte dos antioxidantes no tempo 30 dias de alimentação das aves, já que a concentração do DHA encontra-se aumentada nos tratamentos com os 3 antioxidantes no tempo 0 (zero) dia de estabilidade, sendo esta diferença significativa ($p < 0,05$) para o tratamento com orégano. Já, no tempo 10 dias de estabilidade, este aumento ocorreu nos tratamentos com BHA+BHT e com orégano, no entanto com 20 dias, observou-se o aumento do DHA nos tratamentos com os antioxidantes naturais, embora este acréscimo não foi significativo.

Tabela 22. Determinação do ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6) nas gemas de ovo, expresso como mg de ácido / g de gema

TEMPO 0 DIA ALIMENTAÇÃO				
TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS GEMAS (dias)				
TRATAMENTO	0	10	20	40
Controle 0% linhaça	5,58 ± 0,10	5,17 ± 0,05	4,92 ± 0,33	5,17 ± 0,31
BHA+BHT	3,79 ± 0,20	4,11 ± 0,17	3,34 ± 0,15	3,98 ± 0,38
Orégano	4,85 ± 0,04	4,77 ± 0,18	4,15 ± 0,05	4,46 ± 0,48
Alecrim	5,19 ± 0,21	4,90 ± 0,20	4,38 ± 0,10	4,30 ± 0,42
Controle 5% linhaça	5,51 ± 0,47	4,88 ± 0,12	4,63 ± 0,25	4,68 ± 0,09
BHA+BHT	5,01 ± 0,48	5,03 ± 0,09	4,27 ± 0,17	4,09 ± 0,60
Orégano	5,00 ± 0,19	4,87 ± 0,11	4,74 ± 0,25	4,49 ± 0,45
Alecrim	5,27 ± 0,36	5,08 ± 0,20	4,36 ± 0,06	4,66 ± 0,10

Tabela 22. (Cont.)

TEMPO 10 DIAS ALIMENTAÇÃO				
TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS GEMAS (dias)				
TRATAMENTO	0	10	20	40
Controle 0% linhaça	3,49 ± 0,05	3,14 ± 0,22	3,35 ± 0,47	3,11 ± 0,23
BHA+BHT	2,11 ± 0,15	2,11 ± 0,26	1,83 ± 0,03	1,96 ± 0,00
Orégano	2,74 ± 0,06	2,56 ± 0,05	2,19 ± 0,06	2,42 ± 0,03
Alecrim	3,73 ± 0,46	3,24 ± 0,40	2,60 ± 0,35	2,56 ± 0,49
Controle 5% linhaça	8,69 ± 0,28	8,34 ± 0,11	7,51 ± 0,47	7,53 ± 0,06
BHA+BHT	8,17 * ± 0,04	8,05 ^{ns} ± 0,28	6,88 ^{ns} ± 0,18	8,22 ^{ns} ± 0,78
Orégano	8,12 ** ± 0,19	7,65 ** ± 0,09	6,98 ^{ns} ± 0,47	6,92 ^{ns} ± 0,40
Alecrim	7,87 ** ± 0,05	7,57 ** ± 0,16	7,08 ^{ns} ± 0,35	7,09 ^{ns} ± 0,15
TEMPO 20 DIAS ALIMENTAÇÃO				
TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS GEMAS (dias)				
TRATAMENTO	0	10	20	40
Controle 0% linhaça	2,92 ± 0,08	2,53 ± 0,07	2,60 ± 0,04	2,46 ± 0,08
BHA+BHT	1,79 ± 0,00	1,72 ± 0,02	1,70 ± 0,13	1,52 ± 0,03
Orégano	2,06 ± 0,18	1,82 ± 0,08	1,93 ± 0,05	1,69 ± 0,19
Alecrim	2,49 ± 0,08	2,42 ± 0,19	2,29 ± 0,06	2,13 ± 0,13
Controle 5% linhaça	9,42 ± 0,13	8,31 ± 0,07	8,08 ± 0,10	7,30 ± 0,21
BHA+BHT	8,74 ** ± 0,06	8,18 ^{ns} ± 0,47	8,18 ^{ns} ± 0,11	6,81 ^{ns} ± 0,46
Orégano	8,56 ** ± 0,09	8,10 ^{ns} ± 0,17	8,19 ^{ns} ± 0,21	7,25 ^{ns} ± 0,09
Alecrim	8,66 ** ± 0,12	8,22 ^{ns} ± 0,26	7,93 ^{ns} ± 0,18	7,32 ^{ns} ± 0,23

Tabela 22. (Cont.)

TEMPO 30 DIAS ALIMENTAÇÃO				
TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS GEMAS (dias)				
TRATAMENTO	0	10	20	40
Controle 0% linhaça	3,23 ± 0,08	3,12 ± 0,05	3,15 ± 0,20	2,86 ± 0,21
BHA+BHT	1,86 ± 0,16	1,75 ± 0,06	1,87 ± 0,03	1,50 ± 0,31
Orégano	2,10 ± 0,07	2,04 ± 0,07	2,12 ± 0,06	1,93 ± 0,09
Alecrim	2,42 ± 0,03	2,32 ± 0,06	2,24 ± 0,06	1,98 ± 0,23
Controle 5% linhaça	7,41 ± 0,37	7,83 ± 0,04	7,32 ± 0,06	7,35 ± 0,47
BHA+BHT	7,43 ^{ns} ± 0,17	7,85 ^{ns} ± 0,43	7,20 ^{ns} ± 0,22	6,65 ^{ns} ± 0,62
Orégano	8,10 [*] ± 0,11	8,02 ^{ns} ± 0,36	7,47 ^{ns} ± 0,41	7,07 ^{ns} ± 0,14
Alecrim	7,75 ^{ns} ± 0,21	7,78 ^{ns} ± 0,18	7,54 ^{ns} ± 0,16	6,97 ^{ns} ± 0,48

^{ns} Média não difere estatisticamente do controle 5% linhaça (p>0,05)

^{*} Média difere estatisticamente do controle 5% linhaça ao nível de erro de 5% (p<0,05)

^{**} Média difere estatisticamente do controle 5% linhaça ao nível de erro de 1% (p<0,01)

5.10.2 Determinação do grau de oxidação

A Tabela 23 mostra os valores de absorvância que determinam o grau de oxidação nas gemas de ovo submetidas ao tempo de armazenamento de 40 dias. Segundo estes valores pode-se deduzir que a oxidação lipídica está em função do tempo, assim, de forma geral, houve aumento dos valores de absorvância no decorrer do tempo, quando comparados com o tempo 0 (zero) dia, ocorrendo uma maior oxidação no tempo final (40 dias). Podemos observar também a atuação dos antioxidantes tanto sintéticos quanto naturais na proteção da oxidação lipídica, apresentando diferenças significantes (p<0,01) quando relacionados com o seu respectivo controle. Esta resposta constata-se a partir do tempo 10 dias de alimentação das aves. É importante destacar os valores mais altos de absorvância para os tratamentos com 5% de óleo linhaça quando comparados com 0% de óleo, a partir do tempo 10 dias de

alimentação, verificando-se assim a maior suscetibilidade dos ácidos graxos poliinsaturados à oxidação lipídica.

Tabela 23. Valores de absorvância na determinação do grau de oxidação nas gemas de ovo

TEMPO 0 DIA ALIMENTAÇÃO				
TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS GEMAS (dias)				
TRATAMENTO	0	10	20	40
Controle 0% linhaça	0,129 ± 0,01	0,209 ± 0,01	0,201 ± 0,01	0,253 ± 0,01
BHA+BHT	0,129 ^{ns} ± 0,01	0,168 ^{**} ± 0,00	0,169 ^{**} ± 0,01	0,170 ^{**} ± 0,01
Orégano	0,147 ^{ns} ± 0,01	0,163 ^{**} ± 0,01	0,165 ^{**} ± 0,00	0,195 ^{**} ± 0,01
Alecrim	0,127 ^{ns} ± 0,00	0,159 ^{**} ± 0,01	0,151 ^{**} ± 0,01	0,183 ^{**} ± 0,01
Controle 5% linhaça	0,122 ± 0,01	0,181 ± 0,01	0,183 ± 0,00	0,216 ± 0,01
BHA+BHT	0,136 ^{ns} ± 0,01	0,160 ^{**} ± 0,01	0,175 ^{ns} ± 0,00	0,199 ^{ns} ± 0,01
Orégano	0,146 ^{**} ± 0,00	0,195 ^{ns} ± 0,01	0,192 ^{ns} ± 0,01	0,238 [*] ± 0,00
Alecrim	0,142 ^{**} ± 0,01	0,180 ^{ns} ± 0,01	0,199 ^{**} ± 0,01	0,212 ^{ns} ± 0,02
TEMPO 10 DIAS ALIMENTAÇÃO				
TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS GEMAS (dias)				
TRATAMENTO	0	10	20	40
Controle 0% linhaça	0,196 ± 0,01	0,209 ± 0,01	0,212 ± 0,01	0,264 ± 0,01
BHA+BHT	0,135 ^{**} ± 0,00	0,137 ^{**} ± 0,00	0,171 ^{**} ± 0,01	0,158 ^{**} ± 0,00
Orégano	0,154 ^{**} ± 0,01	0,144 ^{**} ± 0,01	0,199 ^{ns} ± 0,00	0,190 ^{**} ± 0,01
Alecrim	0,187 ^{ns} ± 0,00	0,180 ^{**} ± 0,01	0,196 [*] ± 0,01	0,219 ^{**} ± 0,00
Controle 5% linhaça	0,229 ± 0,01	0,251 ± 0,01	0,262 ± 0,01	0,309 ± 0,01
BHA+BHT	0,203 ^{**} ± 0,01	0,184 ^{**} ± 0,00	0,213 ^{**} ± 0,01	0,225 ^{**} ± 0,01
Orégano	0,229 ^{ns} ± 0,01	0,214 ^{**} ± 0,01	0,247 ^{ns} ± 0,01	0,278 ^{**} ± 0,01
Alecrim	0,201 ^{**} ± 0,00	0,191 ^{**} ± 0,01	0,237 ^{**} ± 0,00	0,258 ^{**} ± 0,01

Tabela 23. (Cont.)

TEMPO 20 DIAS ALIMENTAÇÃO				
TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS GEMAS (dias)				
TRATAMENTO	0	10	20	40
Controle 0% linhaça	0,197 ± 0,01	0,202 ± 0,01	0,249 ± 0,01	0,228 ± 0,01
BHA+BHT	0,158 ** ± 0,01	0,144 ** ± 0,01	0,147 ** ± 0,01	0,174 ** ± 0,00
Orégano	0,144 ** ± 0,01	0,147 ** ± 0,01	0,165 ** ± 0,00	0,166 ** ± 0,00
Alecrim	0,196 ^{ns} ± 0,01	0,182 * ± 0,01	0,203 ** ± 0,01	0,176 ** ± 0,01
Controle 5% linhaça	0,253 ± 0,01	0,253 ± 0,01	0,310 ± 0,01	0,321 ± 0,01
BHA+BHT	0,190 ** ± 0,01	0,177 ** ± 0,00	0,209 ** ± 0,01	0,236 ** ± 0,01
Orégano	0,214 ** ± 0,01	0,224 ** ± 0,01	0,248 ** ± 0,01	0,271 ** ± 0,01
Alecrim	0,227 ** ± 0,01	0,208 ** ± 0,01	0,230 ** ± 0,01	0,270 ** ± 0,00

TEMPO 30 DIAS ALIMENTAÇÃO				
TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS GEMAS (dias)				
TRATAMENTO	0	10	20	40
Controle 0% linhaça	0,186 ± 0,00	0,194 ± 0,00	0,204 ± 0,01	0,299 ± 0,01
BHA+BHT	0,131 ** ± 0,00	0,145 ** ± 0,01	0,139 ** ± 0,01	0,189 ** ± 0,00
Orégano	0,141 ** ± 0,01	0,152 ** ± 0,01	0,147 ** ± 0,01	0,174 ** ± 0,01
Alecrim	0,182 ^{ns} ± 0,00	0,175 ** ± 0,01	0,166 ** ± 0,01	0,246 ** ± 0,01
Controle 5% linhaça	0,213 ± 0,01	0,210 ± 0,01	0,231 ± 0,01	0,315 ± 0,01
BHA+BHT	0,169 ** ± 0,00	0,158 ** ± 0,00	0,182 ** ± 0,01	0,252 ** ± 0,01
Orégano	0,240 ** ± 0,01	0,204 ^{ns} ± 0,01	0,195 ** ± 0,01	0,259 ** ± 0,01
Alecrim	0,207 ^{ns} ± 0,01	0,203 ^{ns} ± 0,01	0,198 ** ± 0,01	0,288 ** ± 0,01

^{ns} Média não difere estatisticamente do controle (p>0,05)

* Média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 5% (p<0,05)

** Média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 1% (p<0,01)

Os efeitos benéficos para a saúde, oferecidos pelos PUFA ω -3 incorporados nas gemas de ovo, podem estar limitados pela qualidade oxidativa. MARSHALL *et al.* (1994) determinaram a estabilidade de ovos com casca de galinhas alimentadas com 1,5% de óleo de menhaden, armazenados à temperatura de refrigeração durante 4 semanas. Os autores ressaltaram que, embora os valores de TBARS nas gemas não tivessem aumentado durante a estocagem dos ovos com casca, os TBARS foram maiores na gema dos ovos com óleo de menhaden quando comparados com o controle. Estes resultados não estão em conformidade com os encontrados em nosso trabalho, no qual verificou-se aumento da oxidação no decorrer do tempo de armazenamento das gemas de ovo a temperatura ambiente (20-25 °C). No entanto foi observada diferença significativa no efeito da dieta, assim como encontrado por MARSHALL *et al.* (1994), que sugerem que a presença de TBARS pode ser devido ao consumo e conseguinte incorporação de produtos da oxidação lipídica por parte das aves ou à produção *in vivo* de TBARS nos fígados das aves alimentadas com dietas altamente insaturadas, sendo após transportados e depositados nas gemas dos ovos.

AYMOND e VAN ELSWYK (1995) mencionam que a proteção lipídica parcial dada pela cobertura da semente de linhaça intacta poderia reduzir o potencial para a produção de ovos contendo lípidos oxidados, portanto, o uso da semente inteira nas dietas das aves resultaria em ovos enriquecidos com PUFA ω -3 com valores de TBARS reduzidos quando comparados com a semente moída e/ou óleo de peixe. No entanto, a utilização de linhaça moída nas dietas das aves, favorece na digestão e absorção do óleo.

Sabe-se que os produtos da oxidação lipídica são tóxicos podendo levar a dano nos tecidos biológicos, portanto, cabe indicar que é necessário considerar a estabilidade oxidativa dos ovos enriquecidos com PUFA ω -3, a qual pode ser alcançada através da utilização de antioxidantes tanto sintéticos quanto naturais.

5.11 ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA 3 NOS TECIDOS DAS AVES ALIMENTADAS COM LINHAÇA

Segundo WOOD e ENSER (1997) a composição de ácidos graxos da carne pode ser modificada através da dieta fornecida aos animais, sendo esta modificação conseguida mais facilmente em porcos e aves, onde o conteúdo dos ácidos graxos poliinsaturados linoléico, α -linolênico e de cadeia longa, respondem rapidamente a concentrações aumentadas desses ácidos graxos na dieta.

Após finalizado o nosso experimento (30 dias de alimentação), a determinação dos ácidos graxos ômega 3 foi realizado em diferentes tecidos das aves, sendo estes, sobrecoxa, coxa, asa, peito, coração, tecido adiposo e fígado.

5.11.1 Ácido α -linolênico (LNA, C18:3)

Segundo os resultados apresentados na Tabela 24, verificou-se que nos tecidos das aves que receberam a dieta com 5% de linhaça houve uma incorporação significativa de ácido α -linolênico (LNA) com relação ao tratamento 0% de linhaça. Estes resultados estão em conformidade com os de CHANMUGAM *et al.* (1992), que compararam a incorporação de diferentes tipos de PUFA ω -3 em coxa de frango, para o qual as aves foram alimentadas com dietas suplementadas com 3 níveis (1,0; 2,5 e 5,0%) de óleos de linhaça e de menhaden. Os tecidos das aves alimentadas com linhaça tiveram níveis significativamente mais elevados de PUFA ω -3 e menor taxa ω -6/ ω -3, que os suplementados com o mesmo nível de óleo de menhaden, devido principalmente à acumulação de LNA

Além disso, foi possível constatar em nosso trabalho que este acréscimo foi de 3,8 a 6,1 vezes nos grupos controle e BHA+BHT, respectivamente. Já, nos grupos orégano e alecrim esta incorporação foi menor com uma proporção de 1,4 a 2,3 vezes, respectivamente, em todos os tecidos com exceção do fígado. Neste órgão, pode-se verificar maior taxa de incorporação do ácido α -

linolênico, mesmo contendo a menor quantidade deste ácido graxo em relação aos outros tecidos. Ainda pode-se observar que os grupos orégano e alecrim apresentaram maior teor de LNA com relação ao grupo controle na dieta 0% de linhaça em todos os tecidos, verificando-se a ação de proteção destes antioxidantes.

ENSER *et al.* (2000) trabalharam com o enriquecimento de tecidos de porco com PUFA ω -3, mediante dietas suplementadas com linhaça contendo 1,5 g de LNA para o controle e 4,5 g / Kg para a dieta testada. Determinaram o perfil lipídico do tecido adiposo, fígado e músculo, encontrando que com essa mudança relativamente pequena, levaram a um aumento do conteúdo de LNA de 56% no músculo, já o fígado, teve uma quantidade 4 vezes maior que no músculo.

É importante destacar que a incorporação significativa de PUFA ω -3 nos tecidos das aves, através da suplementação das dietas com semente de linhaça, leva a uma redução da taxa ω -6/ ω -3.

Tabela 24. Incorporação do ácido α -linolênico (LNA, C18:3) nos tecidos das aves, valores expressos como média (% de área) \pm desvio padrão

	CONTROLE	BHA+BHT	ORÉGANO	ALECRIM
SOBRECOXA				
0% LINHAÇA	1,29 \pm 0,003 ^a	1,18 ** \pm 0,01 ^a	2,38 ** \pm 0,01 ^a	3,17 ** \pm 0,02 ^a
5% LINHAÇA	7,92 \pm 0,01 ^b	6,11 ** \pm 0,01 ^b	3,88 ** \pm 0,02 ^b	5,93 ** \pm 0,02 ^b
COXA				
0% LINHAÇA	1,84 \pm 0,05 ^a	1,22 ** \pm 0,01 ^a	2,18 ** \pm 0,01 ^a	3,08 ** \pm 0,02 ^a
5% LINHAÇA	6,94 \pm 0,04 ^b	5,32 ** \pm 0,03 ^b	3,37 ** \pm 0,01 ^b	5,69 ** \pm 0,03 ^b
ASA				
0% LINHAÇA	1,78 \pm 0,07 ^a	1,18 ** \pm 0,00 ^a	2,23 ** \pm 0,01 ^a	3,20 ** \pm 0,04 ^a
5% LINHAÇA	7,23 \pm 0,02 ^b	5,12 ** \pm 0,01 ^b	3,08 ** \pm 0,00 ^b	5,69 ** \pm 0,02 ^b
PEITO				
0% LINHAÇA	1,83 \pm 0,01 ^a	1,22 ** \pm 0,01 ^a	2,39 ** \pm 0,05 ^a	3,03 ** \pm 0,00 ^a
5% LINHAÇA	7,66 \pm 0,03 ^b	6,37 ** \pm 0,02 ^b	3,85 ** \pm 0,03 ^b	5,65 ** \pm 0,01 ^b
CORAÇÃO				
0% LINHAÇA	1,55 \pm 0,00 ^a	1,19 ** \pm 0,02 ^a	2,33 ** \pm 0,15 ^a	3,03 ** \pm 0,03 ^a
5% LINHAÇA	7,68 \pm 0,01 ^b	7,14 ** \pm 0,02 ^b	3,15 ** \pm 0,003 ^b	6,89 ** \pm 0,02 ^b
TEC.ADIPOSO				
0% LINHAÇA	1,66 \pm 0,00 ^a	1,29 ** \pm 0,00 ^a	2,42 ** \pm 0,01 ^a	3,00 ** \pm 0,00 ^a
5% LINHAÇA	7,68 \pm 0,01 ^b	7,28 ** \pm 0,01 ^b	4,07 ** \pm 0,01 ^b	6,20 ** \pm 0,00 ^b
FÍGADO				
0% LINHAÇA	0,29 \pm 0,01 ^a	0,60 ** \pm 0,01 ^a	1,33 ** \pm 0,00 ^a	0,43 ** \pm 0,01 ^a
5% LINHAÇA	4,27 \pm 0,07 ^b	4,35 ^{ns} \pm 0,04 ^b	3,14 ** \pm 0,01 ^b	4,58 ** \pm 0,09 ^b

^{n.s.} média não difere estatisticamente do controle ($p > 0,05$)

** média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 1% ($p < 0,01$)

^{a b} difere estatisticamente ($p < 0,05$) entre as dietas 0 e 5% linhaça em cada tratamento

5.11.2 Ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6)

Com relação ao ácido docosahexaenóico (DHA) nos tecidos, também houve um aumento significativo quando comparadas as duas dietas (0 e 5% de óleo de linhaça), como pode ser verificado na Tabela 25. Em geral, o conteúdo de DHA na dieta com 5% de óleo de linhaça é maior nos tratamentos com antioxidantes quando comparado com o controle, sendo este aumento significativo, havendo proteção contra a oxidação tanto dos antioxidantes sintéticos quanto dos naturais. Este comportamento não foi observado na dieta com 0% de linhaça. No entanto no fígado, essa proteção pode ser observada na dieta com 0% de linhaça mas não com 5%, onde os tratamentos com antioxidantes apresentam menor quantidade de DHA quando comparados com o controle. É interessante mencionar que no tecido adiposo não foi possível detectar o DHA. Já, o fígado foi o tecido que apresentou a maior concentração deste ácido graxo, podendo ser explicado pelo fato que esse órgão tem a capacidade para biosintetizar PUFA ω -3 de cadeia longa a partir do LNA fornecido pela dieta.

Verificou-se também os índices de incorporação de DHA nos tecidos, tendo como valor máximo 3,8 na sobrecoxa para o tratamento alecrim e mínimo 1,09 no peito para o controle. Num estudo realizado por ENSER *et al.* (2000), que trabalharam com linhaça (1,5 g de LNA para o controle e 4,5 g / Kg para a dieta testada) enriquecendo tecidos de porco com PUFA ω -3, foi observado no músculo um aumento de 35% de DHA e 100% de EPA, os quais foram sintetizados a partir do LNA. Estes ácidos de cadeia longa estiveram também aumentados no tecido adiposo. Além disso, no fígado o acréscimo foi de 20 vezes mais que no músculo para o DHA e 10 vezes para o EPA.

Tabela 25. Incorporação do ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6) nos tecidos das aves, valores expressos como média (% de área) \pm desvio padrão

	CONTROLE	BHA+BHT	ORÉGANO	ALECRIM
SOBRECOXA				
0% LINHAÇA	0,03 \pm 0,00 ^a	0,08 ** \pm 0,00 ^a	0,05 ** \pm 0,00 ^a	0,04 ** \pm 0,00 ^a
5% LINHAÇA	0,06 \pm 0,00 ^b	0,11 ** \pm 0,01 ^b	0,06 ^{ns} \pm 0,00 ^b	0,15 ** \pm 0,00 ^b
COXA				
0% LINHAÇA	0,16 \pm 0,00 ^a	0,09 ** \pm 0,00 ^a	0,16 ^{ns} \pm 0,00 ^a	0,11 ** \pm 0,00 ^a
5% LINHAÇA	0,21 \pm 0,00 ^b	0,26 ** \pm 0,01 ^b	0,35 ** \pm 0,01 ^b	0,30 ** \pm 0,00 ^b
ASA				
0% LINHAÇA	0,13 \pm 0,00 ^a	0,13 ^{ns} \pm 0,00 ^a	0,13 ^{ns} \pm 0,00 ^a	0,16 ** \pm 0,00 ^a
5% LINHAÇA	0,12 \pm 0,00 ^b	0,17 ** \pm 0,00 ^b	0,15 ** \pm 0,00 ^b	0,19 ** \pm 0,00 ^b
PEITO				
0% LINHAÇA	0,11 \pm 0,00 ^a	0,07 ** \pm 0,00 ^a	0,06 ** \pm 0,01 ^a	0,10 * \pm 0,00 ^a
5% LINHAÇA	0,12 \pm 0,01 ^b	0,18 ** \pm 0,00 ^b	0,11 * \pm 0,00 ^b	0,22 ** \pm 0,00 ^b
CORAÇÃO				
0% LINHAÇA	0,04 \pm 0,00 ^a	0,03 ** \pm 0,00 ^a	0,07 ** \pm 0,00 ^a	0,03 ** \pm 0,00 ^a
5% LINHAÇA	0,07 \pm 0,00 ^b	0,07 ^{ns} \pm 0,02 ^b	0,09 ^{ns} \pm 0,00 ^b	0,16 ** \pm 0,01 ^b
TEC.ADIPOSO				
0% LINHAÇA	nd	nd	nd	nd
5% LINHAÇA	nd	nd	nd	< 0,02
FÍGADO				
0% LINHAÇA	0,99 \pm 0,03 ^a	1,13 ** \pm 0,00 ^a	2,50 ** \pm 0,01 ^a	1,19 ** \pm 0,03 ^a
5% LINHAÇA	3,77 \pm 0,25 ^b	2,57 ** \pm 0,09 ^b	2,93 ^{ns} \pm 0,67 ^a	3,63 ^{ns} \pm 0,10 ^b

^{ns.} média não difere estatisticamente do controle ($p > 0,05$)

* média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 5% ($p < 0,05$)

** média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 1% ($p < 0,01$)

^{a, b} letras diferentes difere estatisticamente ($p < 0,05$) entre as dietas 0 e 5% linhaça em cada tratamento

nd não detectado

5.11.3 Ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5)

Segundo a Tabela 26, dos tecidos analisados, o fígado das aves que receberam dieta com 5% de óleo de linhaça foi o único que apresentou o ácido eicosapentaenóico (EPA), sugerindo que este resultado é devido a característica metabólica do fígado na utilização do ácido α -linolênico como seu precursor. No entanto, CHANMUGAM *et al.* (1992) observaram a presença de EPA em coxa de frango, quando usadas dietas com 2,5 e 5,0% de linhaça, encontrando aumento significativo quando comparado com o controle.

Desde o ponto de vista nutricional, a incorporação dos PUFA ω -3 na carne das aves, tornaria viável a sua utilização para o consumo humano, pois seria mais uma fonte destes ácidos graxos.

Para ENSER *et al.* (2000), a concentração de PUFA em qualquer tecido, resulta de vários fatores, entre eles a taxa de síntese, taxa de conversão a outros ácidos graxos, taxa de perda (oxidação ou conversão a outros metabolitos), especificidade de enzimas e quantidade e tipo de lípidos nos quais eles podem ser incorporados.

Tabela 26. Incorporação do ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5) no fígado das aves, valores expressos como média (% de área) \pm desvio padrão

	CONTROLE	BHA+BHT	ORÉGANO	ALECRIM
FÍGADO				
0% LINHAÇA	nd	nd	nd	nd
5% LINHAÇA	0,46 \pm 0,01	0,19 ** \pm 0,01	0,15 ** \pm 0,00	0,18 ** \pm 0,00

** média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 1% ($p < 0,01$)

nd não detectado

A ação protetora dos antioxidantes contra a oxidação lipídica, pode ser verificada considerando os valores dos índices de insaturação dos ácidos graxos que apresentam os diferentes tecidos (Tabela 27). Em todos os tecidos com exceção do fígado, os tratamentos com antioxidantes apresentaram maiores índices de insaturação com relação ao controle tanto na dieta com 0% de óleo de linhaça quanto na dieta com 5%. Desta maneira, pudemos constatar a proteção dos ácidos polinsaturados por parte dos antioxidantes. Já, no fígado, com a dieta 5% de linhaça, houve redução no índice de insaturação dos tratamentos com BHA+BHT, orégano e alecrim, não verificando a proteção por parte dos antioxidantes.

Tabela 27. Índice de insaturação (*) dos tecidos, valores expressos como média \pm desvio padrão

	CONTROLE	BHA+BHT	ORÉGANO	ALECRIM
SOBRECOXA				
0% LINHAÇA	95,07 \pm 0,16	119,48 ** \pm 0,23	120,12 ** \pm 0,09	121,15 ** \pm 0,03
5% LINHAÇA	121,49 \pm 0,16	124,41 ** \pm 0,09	121,42 ^{ns} \pm 0,10	121,91 ** \pm 0,07
COXA				
0% LINHAÇA	115,93 \pm 0,34	120,63 ** \pm 0,25	117,52 ** \pm 0,14	122,81 ** \pm 0,49
5% LINHAÇA	118,64 \pm 0,24	121,11 ** \pm 0,14	121,90 ** \pm 0,18	122,14 ** \pm 0,60
ASA				
0% LINHAÇA	118,86 \pm 0,44	121,76 ** \pm 0,12	119,31 ^{ns} \pm 0,33	124,10 ** \pm 0,28
5% LINHAÇA	122,31 \pm 0,06	125,20 ** \pm 0,07	122,61 ^{ns} \pm 0,10	123,45 * \pm 0,85
PEITO				
0% LINHAÇA	118,93 \pm 0,06	120,96 ** \pm 0,08	120,37 ** \pm 0,32	121,81 ** \pm 0,08
5% LINHAÇA	120,99 \pm 0,34	126,07 ** \pm 0,28	122,41 ** \pm 0,13	122,12 ** \pm 0,11
CORAÇÃO				
0% LINHAÇA	123,19 \pm 0,08	125,43 ** \pm 0,17	126,57 ** \pm 0,43	127,57 ** \pm 0,35
5% LINHAÇA	128,06 \pm 0,04	132,17 ** \pm 0,22	131,38 ** \pm 0,11	129,96 ** \pm 0,09
TEC.ADIPOSO				
0% LINHAÇA	118,82 \pm 0,14	123,52 ** \pm 0,12	123,32 ** \pm 0,10	123,22 ** \pm 0,16
5% LINHAÇA	121,18 \pm 0,02	130,64 ** \pm 0,04	124,34 ** \pm 0,08	123,28 ** \pm 0,15
FÍGADO				
0% LINHAÇA	103,30 \pm 1,83	108,47 ** \pm 0,15	115,64 ** \pm 0,20	99,91 ** \pm 0,14
5% LINHAÇA	127,53 \pm 3,51	111,50 ** \pm 0,35	112,05 ** \pm 3,45	124,01 ^{ns} \pm 0,73

(*) Somatório dos ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados.

^{n.s.} Média não difere estatisticamente do controle ($p > 0,05$).

* Média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 5% ($p < 0,05$).

** Média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 1% ($p < 0,01$).

5.12 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO NOS TECIDOS DAS AVES ALIMENTADAS COM LINHAÇA

A oxidação lipídica (rancidez) é uma das principais causas de deterioração da carne. A rancidez ocorre predominantemente nas membranas celulares dos fosfolípidos altamente insaturados, como um processo autocatalítico mediado por radicais livres (RICHARDSON, 1994). Segundo este autor, a carne de aves contém normalmente mais PUFA que a carne vermelha, daí sua maior suscetibilidade à oxidação. Com o objetivo de reduzir a taxa de oxidação lipídica da carne enriquecida com PUFA ω -3 é necessário o uso de antioxidantes em forma concomitante à fonte de PUFA ω -3. Podendo, desta maneira, eliminar ou minimizar os problemas ocasionados pela oxidação, entre eles a diminuição da vida de prateleira, desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis, afetando o valor nutritivo do alimento e portanto, a segurança do consumidor.

Para WOOD e ENSER (1997), a vitamina E (α -tocoferol) é o melhor antioxidante lipossolúvel em tecidos animais, o qual atua retardando a deterioração oxidativa da carne *post-mortem*. Os autores indicam que, altas concentrações de PUFA ω -3 na carne de porcos e de aves, estão associadas com “flavors” de peixe, cujo desenvolvimento pode ser evitado com níveis altos (supranutricionais) de vitamina E na dieta. MERCIER *et al.* (1998) estudaram o efeito da gordura da dieta e vitamina E em carne de peru, encontrando que este antioxidante retardou de maneira significativa a oxidação lipídica medida pelo método de TBARS. NAM *et al.* (1997) determinaram a influencia da dieta suplementada com 10% de semente de linhaça e da vitamina E na peroxidação lipídica de músculos de frango (peito e coxa), encontrando também aumento da estabilidade oxidativa quando acrescentado o antioxidante natural. Os autores mencionaram que o aumento de malonaldeído foi provocado pela degradação oxidativa dos ácidos graxos com 3 ou mais duplas ligações. Contudo, para PONNAMPALAM *et al.* (2001), que realizaram uma comparação entre a estabilidade lipídica e a quantidade elevada de ácidos graxos ômega 6 (óleo de girassol) e ômega 3 (óleo de peixe) incorporados no músculo de cordeiro,

concluíram que a oxidação lipídica, determinada pelos valores de TBARS, não foi afetada pelos níveis aumentados dos PUFA através da dieta.

Através dos estudos mencionados anteriormente, pôde ser confirmada a atuação da vitamina E, como antioxidante eficaz na inibição da oxidação lipídica em carne enriquecida com PUFA.

Certos compostos extraídos de plantas possuem atividade antioxidante eficaz, sendo alternativas dos antioxidantes sintéticos devido a sua equivalência ou efeito ainda maior na inibição da oxidação lipídica. Muitos estudos têm sido efetuados para comprovar a eficácia desses antioxidantes naturais. Assim, RAMANATHAN e DAS (1992), estudaram o efeito dos flavonóides e outros compostos fenólicos em carne de peixe em concentrações de 30 e 200 ppm, verificando a potente atividade antioxidante desses compostos. Os mesmos autores, no ano seguinte, comprovaram a proteção antioxidante das especiarias secas e frescas em carne cozida de peixe, encontrando que as secas foram antioxidantes mais efetivos que as especiarias frescas. SANT'ÁNA e MANCINI-FILHO (1999) demonstraram que a adição de extratos de alecrim à ração, protege filés de peixe contra a oxidação lipídica. HETTIARACHCHY *et al.* (1996) observaram que extratos alcoólicos de "fenugreek" em concentrações de 500 e 1000 ppm, em carne cozida de vaca, ofereceram estabilidade oxidativa. Para TANG *et al.* (2001), as catequinas do chá (300 ppm) fornecem um efeito antioxidante em diferentes tipos de carnes vermelha, de aves e de peixe, suscetíveis à oxidação lipídica. Para os autores, a alta afinidade das catequinas pela bicamada lipídica do músculo e a capacidade de seqüestrar radicais por parte das catequinas podem ser os possíveis mecanismos para explicar a inibição da oxidação lipídica.

Nosso experimento foi realizado com a finalidade de determinar a atividade antioxidante das especiarias orégano e alecrim, nos tecidos das aves enriquecidos com PUFA ω -3, tendo como referência uma mistura de antioxidantes sintéticos. De acordo com a Tabela 28, que indica a peroxidação lipídica nos tecidos, podemos constatar em forma geral, a redução dos valores de malonaldeído nos tratamentos contendo antioxidantes sintéticos e naturais

nas duas dietas (0 e 5% de óleo de linhaça) quando comparados com o controle nos tecidos sobrecoxa, coxa, asa e peito.

De acordo a estes resultados podemos mencionar que estas especiarias podem ser uma fonte promissora como antioxidantes em carne de aves enriquecida com PUFA ω -3.

Tabela 28. Peroxidação lipídica dos tecidos das aves, valores expressos como média \pm desvio padrão (μmol de MDA/mg de proteína)

	CONTROLE	BHA+BHT	ORÉGANO	ALECRIM
SOBRECOXA				
0% LINHAÇA	2,11 \pm 0,50	2,34 ^{ns} \pm 0,49	1,15 ^{ns} \pm 0,03	1,57 ^{ns} \pm 0,60
5% LINHAÇA	1,34 \pm 0,34	0,80 ^{ns} \pm 0,24	1,17 ^{ns} \pm 0,42	1,67 ^{ns} \pm 0,49
COXA				
0% LINHAÇA	5,59 \pm 0,39	1,84 ^{***} \pm 0,08	1,93 ^{***} \pm 0,32	2,48 ^{***} \pm 0,37
5% LINHAÇA	3,10 \pm 0,48	1,99 ^{ns} \pm 0,23	3,78 ^{ns} \pm 0,39	2,48 ^{ns} \pm 0,58
ASA				
0% LINHAÇA	3,06 \pm 0,55	1,68 ^{**} \pm 0,33	1,80 ^{**} \pm 0,19	1,73 ^{**} \pm 0,19
5% LINHAÇA	4,13 \pm 0,68	2,34 [*] \pm 0,25	3,16 ^{ns} \pm 0,61	2,70 ^{ns} \pm 0,59
PEITO				
0% LINHAÇA	1,09 \pm 0,11	0,65 ^{**} \pm 0,05	0,85 ^{ns} \pm 0,18	0,51 ^{***} \pm 0,08
5% LINHAÇA	1,09 \pm 0,14	0,58 [*] \pm 0,16	0,88 ^{ns} \pm 0,27	0,43 ^{**} \pm 0,06
CORAÇÃO				
0% LINHAÇA	1,75 \pm 0,45	1,87 ^{ns} \pm 0,09	2,31 ^{ns} \pm 0,21	2,15 ^{ns} \pm 0,40
5% LINHAÇA	1,84 \pm 0,07	2,10 ^{ns} \pm 0,26	1,91 ^{ns} \pm 0,07	1,84 ^{ns} \pm 0,48
TEC.ADIPOSO				
0% LINHAÇA	6,13 \pm 0,80	4,35 [*] \pm 0,66	6,65 ^{ns} \pm 0,81	7,04 ^{ns} \pm 0,33
5% LINHAÇA	8,56 \pm 0,81	8,18 ^{ns} \pm 0,72	8,31 ^{ns} \pm 0,84	8,30 ^{ns} \pm 0,87
FÍGADO				
0% LINHAÇA	0,79 \pm 0,13	0,71 ^{ns} \pm 0,11	1,45 ^{***} \pm 0,14	1,11 [*] \pm 0,05
5% LINHAÇA	0,76 \pm 0,21	0,63 ^{ns} \pm 0,02	1,20 ^{**} \pm 0,03	0,89 ^{ns} \pm 0,05

n.s. Média não difere estatisticamente do controle ($p > 0,05$).

* Média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 5% ($p < 0,05$).

** Média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 1% ($p < 0,01$).

*** Média difere estatisticamente do controle ao nível de erro de 0,1% ($p < 0,001$).

5.13 ANÁLISE SENSORIAL DAS GEMAS DE OVO

5.13.1 Avaliação sensorial dos atributos aparência, odor e sabor das gemas de ovos

A Tabela 29 apresenta os resultados da avaliação sensorial das gemas de ovos de todos os tratamentos, expressos como média \pm desvio padrão, avaliados pelo painel de julgadores no teste Diferença-do-Controle em relação aos atributos de aparência, odor e sabor. Na escala, o grau de diferença pode variar de 0 (nenhuma diferença de P) a 8 (extremamente diferente de P). Para a aparência, as amostras revelaram médias com valores no intervalo de 0,45 a 5,59, caracterizadas entre “nenhuma diferença de P” e “muito diferente de P”. Para o odor, de 0,86 a 3,72, até “moderadamente diferente de P”. O sabor apresentou valores de 0,69 a 2,97, entre “nenhuma diferença de P” a “ligeiramente e moderadamente diferente de P”. Os dados mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) dos tratamentos suplementados com óleo de linhaça quando comparados ao controle 0 (zero) dia, nos atributos aparência, odor e sabor, sendo considerados entre “ligeiramente e moderadamente diferentes de P”, exceto para o tratamento óleo de linhaça, com a nota 5,59 para o atributo aparência, que foi avaliado entre “moderadamente e muito diferente de P”. Em todos os tratamentos, o atributo aparência esteve associado à cor amarela, onde os julgadores descreveram as diferenças pela diminuição da intensidade desta cor, comparados ao controle 0 (zero) dia.

Os tratamentos com a adição de antioxidantes naturais (orégano e alecrim) e sintéticos (BHA e BHT) diferiram estatisticamente a pelo menos 5% de probabilidade, do controle 0 (zero) dia para o atributo aparência, “ligeiramente diferente de P”, mas quanto ao odor e sabor não diferiram do controle. O controle 30 dias (dieta basal de milho) diferiu na aparência do controle 0 (zero) dia (dieta comercial), sendo caracterizado como “moderadamente diferente de P”; o mesmo não ocorreu para os atributos de odor e sabor.

Quanto ao odor e sabor das gemas de ovo, o painel de julgadores manifestou comentários sendo mencionados, para o odor quanto para o sabor, como lembrando levemente a peixe, intenso e pouco característico da gema de ovo, além de comentar que o sabor apresenta um residual ligeiramente amargo, havendo necessidade da adição de flavorizantes para a eliminação destas características. Estes resultados estão de acordo com CASTON *et al.* (1994), onde 29% dos provadores treinados, notaram o sabor de peixe em ovos de aves alimentadas com 20% de linhaça, bem como com JIANG *et al.* (1992), onde 1/3 dos panelistas treinados e não treinados detectaram esse sabor em ovos, quando as aves foram alimentadas com 15% de linhaça. Estas observações também guardam concordância com os resultados obtidos por WARNANTS *et al.*, 1998 os quais detectaram um “off-flavour” de peixe em salami elaborado com gordura de porco incorporada de PUFA ω -3 através da administração aos animais de uma dieta suplementada com semente de linhaça. Estas alterações de sabor e odor e geração de “off-flavour” poderiam ser o resultado de rancidez dos PUFA ω -3 seja em alimentos e/ou produtos animais como é expressado por SIM (1998), já que estes ácidos são particularmente susceptíveis à oxidação lipídica e mesmo pequenas diferenças na concentração destes ácidos graxos podem ser importantes no desenvolvimento do processo oxidativo (LOPEZ-BOTE, *et al.*, 1998).

Tabela 29. Avaliação sensorial dos atributos de aparência, odor e sabor das gemas de ovos dos tratamentos.

TRATAMENTOS	* Valores médios no teste Diferença–do-Controle		
	Aparência	Odor	Sabor
Controle 0 dia ¹	1,00 ± 0,24	1,90 ± 0,34	1,17 ± 0,29
Controle 30 dias	3,77** ± 0,35	1,52 ^{n.s.} ± 0,35	1,38 ^{n.s.} ± 0,37
Linhaça	5,59** ± 0,44	3,72** ± 0,46	2,97** ± 0,43
Controle 0 dia ¹	0,45 ± 0,14	1,10 ± 0,27	1,10 ± 0,26
BHA/BHT	1,28* ± 0,25	1,93 ^{n.s.} ± 0,31	1,48 ^{n.s.} ± 0,36
BHA/BHT + Linhaça	2,86*** ± 0,28	2,17* ± 0,35	2,21* ± 0,38
Controle 0 dia ¹	0,48 ± 0,22	0,86 ± 0,28	0,81 ± 0,28
Orégano	2,71** ± 0,31	1,43 ^{n.s.} ± 0,34	1,71 ^{n.s.} ± 0,33
Orégano + Linhaça	3,95** ± 0,30	2,90** ± 0,36	2,81** ± 0,33
Controle 0 dia ¹	0,72 ± 0,19	0,90 ± 0,22	0,69 ± 0,19
Alecrim	1,93** ± 0,24	1,45 ^{n.s.} ± 0,27	1,14 ^{n.s.} ± 0,25
Alecrim + Linhaça	3,24** ± 0,32	2,28** ± 0,30	2,1**4 ± 0,34

* Valores expressos como média ± desvio padrão de 29 provadores, onde: 0=nenhuma diferença de P; 2=ligeiramente diferente de P; 4=moderadamente diferente de P, 6=muito diferente de P; 8=extremamente diferente de P.

^{n.s.} Média não difere estatisticamente do controle 0 (zero) dia (p>0,05).

* Média difere estatisticamente do controle 0 dia ao nível de erro de 5% (p<0,05).

** Média difere estatisticamente do controle 0 dia ao nível de erro de 1% (p<0,01).

*** Média difere estatisticamente do controle 0 dia ao nível de erro de 0,1% (p<0,001).

¹Referência codificada

Destacando os valores indicativos obtidos com o óleo de linhaça apresentados na Tabela 30, pode-se verificar que a adição dos antioxidantes naturais e sintéticos diminuíram os valores médios dos atributos aparência, odor e sabor das gemas de ovos, sendo que BHA/BHT e alecrim abaixaram significativamente (p<0,001) os valores da aparência, quando comparados com a amostra controle: linhaça 5%, além de diferir estatisticamente ao nível de 5% enquanto ao odor. Já a incorporação de orégano provocou uma diferença estatística (p<0,05) na aparência das gemas. Com relação ao sabor, a presença dos antioxidantes não difere estatisticamente quando comparados com a amostra controle: linhaça 5%, mas observou-se redução dos valores.

Tabela 30. Atuação dos antioxidantes naturais e sintéticos nos atributos aparência, odor e sabor das gemas de ovos

TRATAMENTOS	* Valores médios no teste Diferença–do-Controle		
	Aparência	Odor	Sabor
Linhaça	5,59 ± 0,44	3,72 ± 0,46	2,97 ± 0,43
BHA/BHT + Linhaça	2,86*** ± 0,28	2,17* ± 0,35	2,21 ^{ns} ± 0,38
Orégano + Linhaça	3,95* ± 0,30	2,90 ^{ns} ± 0,36	2,81 ^{ns} ± 0,33
Alecrim + Linhaça	3,24*** ± 0,32	2,28* ± 0,30	2,14 ^{ns} ± 0,34

* Valores expressos como média ± desvio padrão de 29 provadores, onde: 0=nenhuma diferença de P; 2=ligeiramente diferente de P; 4=moderadamente diferente de P, 6=muito diferente de P; 8=extremamente diferente de P.

^{n.s.} Média não difere estatisticamente da amostra controle: linhaça (p>0,05).

* Média difere estatisticamente da amostra controle: linhaça (p<0,05).

*** Média difere estatisticamente da amostra controle: linhaça (p<0,001).

5.13.2 Avaliação da intensidade da cor amarela das gemas de ovos

Na Tabela 31, podem ser observados os resultados obtidos através da escala não estruturada de 10 cm, utilizada para avaliar a intensidade da cor amarela, onde foram comparados simultaneamente todos os tratamentos. Houve diferença estatística (p<0,05) entre eles, revelando valores médios menores (cor amarela mais clara) pelo uso dos antioxidantes e ainda mais reduzidos pela presença da linhaça. O controle 30 dias diferiu do controle 0 (zero) dia, contudo não diferiu do BHA/BHT. Os antioxidantes, alecrim e orégano não diferiram entre si, assim como todos os tratamentos com antioxidantes + linhaça. As gemas de ovos com linhaça revelaram o menor valor na escala (cor amarela mais clara) sem diferir significativamente de BHA/BHT + linhaça, existindo a possibilidade de adição de carotenóides com o propósito de intensificar a cor amarela. Estes resultados não apresentam concordância com os encontrados por FARRELL (1998), que comparou ovos enriquecidos com óleo de peixe e linhaça (30 e 10 g de óleo /kg de ração respectivamente) com ovos comerciais. Neste estudo verificou-se uma cor muito mais clara na gema para ovos não enriquecidos.

Tabela 31. Avaliação da cor amarela em escala não estruturada, dos tratamentos.

AMOSTRAS DE GEMAS DE OVO	Médias*
Controle 0 (zero) dia	8,1 ^a ± 0,4
BHA/BHT	6,9 ^b ± 0,4
Controle 30 dias	6,3 ^b ± 0,4
Alecrim	4,9 ^c ± 0,4
Orégano	4,3 ^c ± 0,4
Alecrim + Linhaça	3,3 ^d ± 0,4
Orégano + Linhaça	2,7 ^d ± 0,3
BHA/BHT + Linhaça	2,0 ^{d,e} ± 0,2
Linhaça	1,3 ^e ± 0,2

* Média e erro-padrão da média de 18 julgamentos. Escala não estruturada de 10 cm, para cor amarela, onde 0=clara; 10=escura.

^{a,b,c,d,e} Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes, diferem significativamente entre si ao nível de erro de 5%.

5.13.3 Avaliação instrumental da cor das gemas de ovos

Segundo a Tabela 32, os resultados da avaliação objetiva da cor L*, a* e b* dos tratamentos mostraram diferenças estatísticas significativas (p<0,05) entre estes, quando comparados ao controle 0 (zero) dia, exceto para a luminosidade L* dos antioxidantes BHA/BHT, que não diferiram entre si (p>0,05). A adição de óleo de linhaça elevou os valores médios de L*, conferindo maior luminosidade. O antioxidante alecrim resultou num valor de L* estatisticamente superior ao controle 0 (zero) dia, o mesmo não sendo observado para os demais antioxidantes. Nos tratamentos, os valores de a* (vermelho/verde) apresentaram-se estatisticamente (p<0,05) menores que o controle 0 (zero) dia e não houve diferenças significativas entre todos os tratamentos com antioxidantes e com antioxidantes + linhaça. Os valores de b* (amarelo/azul) foram estatisticamente (p<0,05) inferiores pela adição da linhaça e/ou antioxidantes, quando comparados ao controle 0 (zero) dia, exceto para BHA/BHT, que não diferiu do mesmo. O controle 30 dias diferiu estatisticamente (p<0,05) do controle 0 (zero) dia nos valores de a* e b*,

apresentando-se inferiores na intensidade do amarelo, com mudanças de +a* para -a*, revelando a tonalidade esverdeada. O controle 30 dias apresentou diferença estatística do tratamento com alecrim para a cor vermelha/verde e de todos os tratamentos com linhaça (exceto orégano + linhaça) para a cor amarela.

Tabela 32. Avaliação instrumental da cor das gemas inteiras de ovos dos tratamentos.

TRATAMENTOS	* Valores médios dos atributos de cor		
	Luminosidade (L*)	Vermelho/verde (+a*/-a*)	Amarelo/Azul (+b*/-b*)
Controle 0 (zero) dia	82,90 ^b ± 0,80	0,66 ^a ± 0,85	39,43 ^a ± 2,31
Controle 30 dias	84,03 ^b ± 0,58	-0,64 ^b ± 0,28	33,91 ^b ± 0,09
Linhaça	85,51 ^a ± 0,52	-1,23 ^b ± 0,24	29,22 ^c ± 1,43
Controle 0 (zero) dia	82,90 ^a ± 0,80	0,66 ^a ± 0,85	39,43 ^a ± 2,31
BHA/BHT	83,17 ^a ± 1,21	-0,78 ^b ± 0,15	35,38 ^a ± 0,91
BHA/BHT + Linhaça	84,68 ^a ± 0,66	-1,07 ^b ± 0,34	30,28 ^b ± 2,68
Controle 0 (zero) dia	82,90 ^b ± 0,80	0,66 ^a ± 0,85	39,43 ^a ± 2,31
Orégano	83,22 ^b ± 0,76	-1,55 ^b ± 0,39	31,01 ^b ± 1,54
Orégano + Linhaça	84,88 ^a ± 0,26	-0,66 ^b ± 0,21	31,64 ^b ± 1,11
Controle 0 (zero) dia	82,90 ^b ± 0,80	0,66 ^a ± 0,85	39,43 ^a ± 2,31
Alecrim	84,64 ^a ± 0,24	-1,11 ^b ± 0,21	31,96 ^b ± 0,64
Alecrim + Linhaça	85,37 ^a ± 0,31	-1,04 ^b ± 0,10	30,00 ^b ± 0,52

* Valores expressos como média de 4 metades de ovos ± desvio-padrão (triplicata)

^{a,b,c} Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes, diferem estatisticamente entre si ao nível de erro de 5%.

Na Tabela 33 foram comparados os valores objetivos da cor L*, a*, b* de todos os tratamentos, em conjunto. Os resultados revelaram a variação da luminosidade L* de 82,90 (controle 0 dia) a 85,51 (linhaça). O vermelho/verde de 0,66 (controle 0 dia) a -1,55 (orégano) e intervalo de 29,22 (linhaça) a 39,43 (controle 0 dia) para o amarelo.

Tabela 33. Avaliação instrumental global da cor das gemas inteiras de ovos dos tratamentos.

TRATAMENTOS	* Valores médios do atributo de cor		
	Luminosidade L*	Vermelho/verde +a*/-a*	Amarelo/azul b*/-b*
Controle 0 dia	82,90 ^c ± 0,80	0,66 ^a ± 0,85	39,43 ^a ± 2,31
Controle 30 dias	84,03 ^{a,b,c} ± 0,58	-0,64 ^b ± 0,28	33,91 ^{b,c} ± 0,09
BHA/BHT	83,17 ^{b,c} ± 1,21	-0,78 ^{b,c} ± 0,15	35,38 ^b ± 0,91
Alecrim	84,64 ^{a,b} ± 0,24	-1,11 ^{b,c} ± 0,21	31,96 ^{b,c,d} ± 0,64
Orégano	83,22 ^{b,c} ± 0,76	-1,55 ^c ± 0,39	31,01 ^{c,d} ± 1,54
Alecrim + Linhaça	85,37 ^a ± 0,31	-1,04 ^{b,c} ± 0,10	30,00 ^d ± 0,52
Orégano + Linhaça	84,88 ^a ± 0,26	-0,66 ^{b,c} ± 0,21	31,64 ^{c,d} ± 1,11
BHA/BHT + Linhaça	84,68 ^{a,b} ± 0,66	-1,07 ^{b,c} ± 0,34	30,28 ^d ± 2,68
Linhaça	85,51 ^a ± 0,52	-1,23 ^{b,c} ± 0,24	29,22 ^d ± 1,43

*Valores expressos como média de 4 metades de ovos ± desvio padrão (triplicata).

^{a,b,c,d} Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes, diferem estatisticamente entre si ao nível de erro de 5%.

A Figura 29 apresenta a correlação das avaliações sensorial (escala não estruturada) e instrumental, considerando os valores de luminosidade (*L). Foi obtido um coeficiente de correlação (r) de -0,8265, valor que expressa uma correlação de 82,65%. O coeficiente de correlação (r) tem significância estatística quando for maior ou igual a 80% em módulo. Observa-se que valores baixos na avaliação sensorial (cor amarela mais clara) correspondem a valores mais altos na luminosidade, ou seja há uma relação inversa.

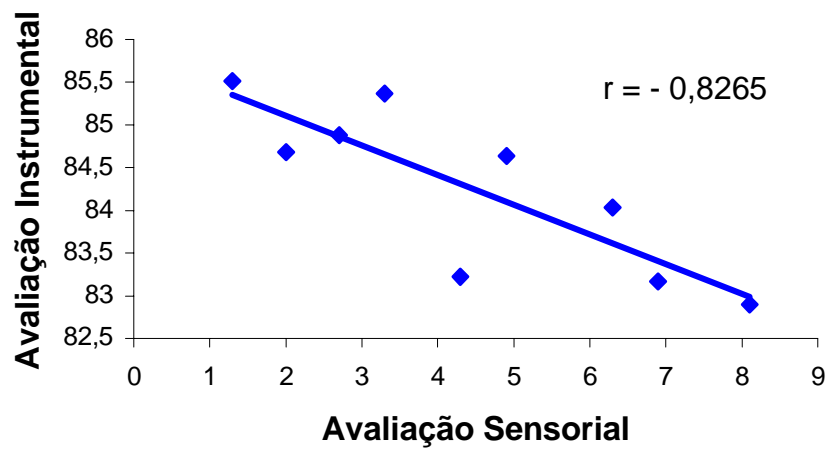


Figura 29. Correlação da avaliação sensorial e instrumental da cor das gemas de ovos.

6. CONCLUSÕES

- A utilização de semente de linhaça na ração de galinhas poedeiras aumentou o teor de PUFA ω -3 nos ovos.
- ácido graxo α -linolênico (LNA) presente em maior quantidade na ração com linhaça foi o que apresentou maior índice de incorporação nas gemas dos ovos, sendo esta observada após 20 dias de alimentação das aves.
- A atividade antioxidante de extratos das especiarias alecrim e orégano aumentou a estabilidade dos ovos enriquecidos com PUFA ω -3.
- Os tecidos das aves alimentadas com semente de linhaça apresentaram teores mais elevados de PUFA ω -3, sendo estes uma fonte alternativa destes ácidos graxos para o consumo humano.
- As gemas dos ovos das aves alimentadas com ração contendo óleo de linhaça e/ou antioxidantes naturais e sintéticos apresentaram-se alteradas na aparência, no entanto, nos atributos odor e sabor foram detectadas características diferentes com a incorporação de óleo de linhaça.
- Os antioxidantes sintéticos revelaram tendência a uma menor influência na cor das gemas de ovos, seguidos pelos antioxidantes alecrim e orégano, que não diferiram entre si na avaliação subjetiva da cor em escala não estruturada. A adição da linhaça intensificou ainda mais a cor amarelo-clara das gemas de ovos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, D.S.P. Antioxidantes: conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. **ARS Curandi**, São Paulo, nov., p.141-164, 1993.
- ACEITES & GRASAS. Lino, una oleaginosa con historia. *Aceites & Grasas*, 38, 59-72, 2000. Apud: TURATTI, J.M. Óleos vegetais como fonte de alimentos funcionais. **Óleos e Grãos**, São Caetano do Sul, set./out., n.56, p.20-27, 2000.
- AMAROWICZ, R., WANASUNDARA, U., WANASUNDARA, J., SHAHIDI, F. Antioxidant activity of ethanolic extracts of flaxseed in a β -carotene-linoleate model system. **J. Food Lipids**, Trumbull, v.1, p.111-117, 1993.
- ANDERSEN, S., 1995. Microencapsulated marine omega-3 fatty acids for use in the food industry. *Food Technol. Eur.* Dec./Jan.: 104-106. Apud: SIMOPOULOS, A.P. Symposium: role of poultry products in enriching the human diet with N-3 PUFA: human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. **Poult. Sci.**, Savoy, v.79, p.961-970, 2000.
- ARJMANDI, B.H., KHAN, D.A., JUMA, S., DRUM, M.L., VENKATESH, S., SOHN, E., WEI, L., DERMAN, R. Whole flaxseed consumption lowers serum LDL-cholesterol and lipoprotein concentrations in postmenopausal women. **Nutr. Res.**, New York, v.18, n.7, p.1203-1214, 1998.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Teste de comparação múltipla em análise sensorial dos alimentos e bebidas**: NBR 13.526. Rio de Janeiro, ABNT, 1995, 9p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16.ed. V.1, n. 960.52/12.1.07. Washington: AOAC, 1995. p.7.
- ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE AVICULTURA. Consumo *per capita* de ovos. Disponível em: <<http://www.apa.com.br/estatisticas/conspercavos.htm>>. Acesso em: 10/12/2002.
- AYMOND, W.M., VAN ELSWYK, M.E. Yolk thiobarbituric acid reactive substances and n-3 fatty acids in response to whole and ground flaxseed. **Poult. Sci.**, Savoy, v.74, p.1388-1394, 1995.

- BAUCELLS, M.D., CRESPO, N., BARROETA, A.C., LÓPEZ-FERRER, S., GRASHORN, M.A. Incorporation of different polyunsaturated fatty acids into eggs. **Poult. Sci.**, Savoy, v.79, p.51-59, 2000.
- BENNETT M. **The flaxseed revolution**: nature's source of omega-3, ligninas e fibra. Califórnia: Optimal Healthspan Publications, 1998. 88p.
- BLOUNT, J.D., HOUSTON, D.C., MØLLER, A.P. Why egg yolk is yellow. **Tree**, Oak Ridge, v.15, n.2, p.47-49, 2000.
- BORN, F. ω -3 products: from research to retail. **World Rev. Nutr. Diet.**, Basel, v.83, p.166-175, 1998.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.72, p.677-685, 1985.
- CALDER, P.C. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.31, p.467-490, 1998.
- CARAGAY, A.B. Cancer-preventive foods and ingredients. **Food Technol.**, Chicago, v.46, n.4, p.65-68, 1992.
- CASTON, L., LEESON, S. Research note: dietary flax and egg composition. **Poult. Sci.**, Savoy, v.69, p.1617-1620, 1990.
- CASTON, L.J., SQUIRES, E.J., LEESON, S. Hen performance, egg quality, and the sensory evaluation of eggs from SCWL hens fed dietary flax. **Can. J. Anim. Sci.**, Ottawa, v.74, p.347-353, 1994.
- CHANMUGAM, P., BOUDREAU, M., BOUTTE, T., PARK, R.S., HEBERT, J., BERRIO, L., HWANG, D.H. Incorporation of different types of n-3 fatty acids into tissue lipids of poultry. **Poult. Sci.**, Savoy, v.71, p.516-521, 1992.
- CHEN, Z.-Y., RATNAYAKE, W.M.N., CUNNANE, S.C. Oxidative stability of flaxseed lipids during baking. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.71, n.6, p.629-632, 1994.
- CHERIAN, G., SIM, J.S. Effect of feeding full fat flax and canola seeds to laying hens on the fatty acid composition of eggs, embryos, and newly hatched chicks. **Poult. Sci.**, Savoy, v.70, p.917-922, 1991.

- CHERIAN, G., SIM, J.S. Changes in the breast milk fatty acids and plasma lipids of nursing mothers following consumption of n-3 polyunsaturated fatty acid enriched eggs. **Nutrition**, New York, v.12, n.1, p.8-12, 1996.
- CHEVOLLEAU, S., MALLET, J.F., UCCIANI, E., GAMISANS, J., GRUBER, M. Antioxidant activity in leaves of some mediterranean plants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.69, n.12, p.1269-1271, 1992.
- CHIARPOTTO, E., SCAVAZZA, A., LEONARDUZZI, G., CAMANDOLA, S., BIASI, F., TEGGIA, P.M., GARAVOGLIA, M., ROBECCHI, A., RONCARI, A., POLI, G. Oxidative damage and transforming growth factor b1 expression in pretumoral and tumoral lesions of human intestines. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.22, p.889-894, 1997.
- CINTRA, R.M.G., MANCINI-FILHO, J. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos *in vitro* e *in vivo*. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, São Paulo, v.22, p.49-62, 2001.
- CONNOR, W.E. α -linolenic acid in health and disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.69, n.5, p.827-828, 1999.
- DABROWSKI, K.J., SOSULSKI, F.W. Quantitation of free and hydrolyzable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.32, n.1, p.123-127, 1984.
- DABROWSKI, K.J., SOSULSKI, F.W. Composition of free and hydrolyzable phenolic acids in defatted flours of ten oilseeds. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.32, n.1, p.128-130, 1984.
- DE LA TORRE, M.C., LÓPEZ, E. El papel de los antioxidantes. **Alimentaria**, Madrid, jun., p.19-27, 1997.
- DORMANDY, T.L. Antioxidant vitamins and nutrients. In: GUTTERIDGE, J.M.C., HALLIWELL, B. **Antioxidants in nutrition, health, and disease**. New York: Oxford University Press, 1994. p.63-81.
- DZIEZAK, J. Fats, oils, and fat substitutes. **Food Technol.**, Chicago, v.43, p.66-74, 1989.
- ECONOMOU, K.D., OREOPOULOU, V., THOMOPOULOS, C.D. Antioxidant activity of some plant extracts of the family labiatae. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.68, n.2, p.109-113, 1991.

- ENSER, M., RICHARDSON, R.I., WOOD, J.D., GILL, B.P., SHEARD, P.R. Feeding linseed to increase the n-3 PUFA of pork: fatty acid composition of muscle, adipose tissue, liver and sausages. **Meat Sci.**, Oxford, v.55, p.201-212, 2000.
- FARRELL, D.J. The importance of eggs in a healthy diet. **Poult. Int.**, Mount Morris, sept., p.72-78, 1997.
- FARRELL, D.J. Enrichment of hen eggs with n-3 long-chain fatty acids and evaluation of enriched eggs in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.68, p.538-544, 1998.
- FERRIER, L.K., CASTON, L., LEESON, S., SQUIRES, E.J., CELI, B., THOMAS, L., HOLUB, B.J. Changes in serum lipids and platelet fatty acid composition following consumption of eggs enriched in alpha-linolenic acid (LnA). **Food Res. Int.**, Oxford, v.25, p.263-268, 1992.
- FERRIER, L.K., CASTON, L.J., LEESON, S., SQUIRES, J., WEAVER, B.J., HOLUB, B.J. α -linolenic acid- and docosahexaenoic acid-enriched eggs from hens fed flaxseed: influence on blood lipids and platelet phospholipid fatty acids in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.62, p.81-86, 1995.
- FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.226, p.497-509, 1957.
- FRANKEL, E.N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. **Food Chem.**, Kidlington, v.57, n.1, p.51-55, 1996.
- FRANKEL, E.N., HUANG, S.W., AESCHBACH, R., PRIOR, E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid in bulk oil and oil-in-water emulsion. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.44, p.131-135, 1996.
- GARCIA, D.J. Omega-3 long-chain PUFA nutraceuticals. **Food Technol.**, Chicago, v.52, n.6, p.44-49, 1998.
- GARCIA, C., ALBALA, C. Composición lipídica de huevos de gallinas alimentadas con productos grasos y proteicos marinos. **Arch. Latinoam. Nutr.**, Caracas, v.48, n.1, p.71-76, 1998.

- HANDS, E.S. Lipid composition of selected foods. In: HUI, Y.H. **Bailey's industrial oil & fat products**. Edible oil & fat products: general applications. 5th ed. V.1. New York: Wiley, 1996. p.441-505.
- HARGIS, P.S., VAN ELSWYK, M.E., HARGIS, B.M. Dietary modification of yolk lipid with menhaden oil. **Poult. Sci.**, Savoy, v.70, p.874-883, 1991.
- HARRIS, W. Fish oils, omega-3 polyunsaturated fatty acids, and coronary heart disease. **Background**, v.2, n.1, p.1-8, 1997.
- HARTMAN, L., LAGO, B.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Pract.**, London, v.22, p.475-477, 1973.
- HERBER, S.M., VAN ELSWYK, M.E. Dietary marine algae promotes efficient deposition of n-3 fatty acids for the production of enriched shell eggs. **Poult. Sci.**, Savoy, v.75, p.1501-1507, 1996.
- HERBER-MCNEILL, S.M., VAN ELSWYK, M.E. Dietary marine algae maintains egg consumer acceptability while enhancing yolk color. **Poult. Sci.**, Savoy, v.77, p.493-496, 1998.
- HETTIARACHCHY, N.S., GLENN, K.C., GNANASAMBANDAM, R., JOHNSON, M.G. Natural antioxidant extract from fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) for ground beef patties. **J. Food Sci.**, Chicago, v.61, n.3, p.516-519, 1996.
- HOGG, N., KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1411, p.378-384, 1999.
- HOULIHAN, C.M., HO, C.T., CHANG, S.S. Elucidation of the chemical structure of novel antioxidant, rosmaridiphenol, isolated from rosemary. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.61, n.6, p.1036-1039, 1984.
- HU, F.B., MANSON, J.E., WILLETT, W.C. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. **J. Am. Coll. Nutr.**, New York, v.20, n.1, p.5-19, 2001.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3^a ed. São Paulo: IAL, 1985. v.1, p.16-76, 245-266.

- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Method of investigating sensitivity of taste. **International Standard ISO/DIS, n. 3972, Geneva: ISO, 1990, 5p.**
- IULIANO, L., COLAVITA, A.R., LEO, R., PRATICO, D., VIOLI, F. Oxygen free radicals and platelet activation. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.22, p.999-1006, 1997.
- JIANG, Z., AHN, D.U., LADNER, L., SIM, J.S. Influence of feeding full-fat flax and sunflower seeds on internal and sensory qualities of eggs. **Poult. Sci.**, Savoy, v.71, p.378-383, 1992.
- KÄHKÖNEN, M.P., HOPIA, A.I., VUORELA, H.J., RAUHA, J.-P., PIHLAJA, K., KUJALA, T.S., HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.47, p.3954-3962, 1999.
- KARAKAYA, S., EL, S.N., TAS, A.A. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, London, v.52, p.501-508, 2001.
- KELLEY, D.S., RUDOLPH, I.L. Effect of individual fatty acids of ω -6 and ω -3 type on human immune status and role of eicosanoids. **Nutrition**, New York, v.16, p.143-145, 2000.
- KIKUZAKI, H., NAKATANI, N. Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Origanum vulgare* L.). **Agric. Biol. Chem.**, v.53, n.2, p.519-524, 1989.
- KWAK, N.S., JUKES, D.J. Functional foods. Part 1. The development of a regulatory concept. **Food Control**, Oxford, v.12, p.99-107, 2001.
- LAGOURI, V., BOSKOU, D. Nutrient antioxidants in oregano. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, London, v.47, p.493-497, 1996.
- LAURITZEN, L., HANSEN, H.S., JØRGENSEN, M.H., MICHAELSEN, K.F. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. **Progr. Lipid Res.**, Oxford, v.40, p.1-94, 2001.
- LAYNE, K.S., GOH, Y.K., JUMPSSEN, J.A., RYAN, E.A., CHOW, P., CLANDININ, M.T. Normal subjects consuming physiological levels of 18:3

- (n-3) and 20:5 (n-3) from flaxseed or fish oils have characteristic differences in plasma lipid and lipoprotein fatty acid levels. **J. Nutr.**, Bethesda, v.126, p.2130-2140, 1996.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. **Principles of biochemistry**. 2.ed. New York: Worth Publishers, 1993. 1013p.
- LEWIS, N.M., SEBURG, S., FLANAGAN, N.L. Enriched eggs as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids for humans. **Poult. Sci.**, Savoy, v.79, p.971-974, 2000.
- LINSCHAEER, W.G., VERGROESEN, A.J. Lipids. In: SHILS, M.E., OLSON, A., SHIKE, M., eds. **Modern nutrition in health and disease**. 8th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994, p.47-88.
- LÖLIGER, J. The use of antioxidants in food. In ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B. Free radicals and food additives. Taylor and Francis: London, 1991, p. 121-150.
- LOPEZ-BOTE, C.J., SANZ ARIAS, R., REY, A.I., CASTAÑO, A., ISABEL, B., THOS, J. Effect of free-range feeding on n-3 fatty acid and α -tocopherol content and oxidative stability of eggs. **Anim. Feed Sci. Technol.**, Amsterdam, v.72, p.33-40, 1998.
- LYNCH, S.M., FREI, B. Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.34, p.1745-1753, 1993.
- MADSEN, H.L., BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends Food Sci. Technol.**, Oxford, v.6, p.271-277, 1995.
- MADSEN, L., RUSTAN, A.C., VAAGENES, H., BERGE, K., DYROY, E., BERGE, R.K. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid affect mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in relation to substrate preference. **Lipids**, Champaign, v.34, p.951-963, 1999.
- MAKRIDES, M., GIBSON, R.A. Specific requirements for n-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids for preterm and term infants? **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, Weinheim, v.103, p.373-378, 2001.
- MALCOLMSON, L.J., PRZYBYLSKI, R., DAUN, J.K. Storage stability of milled flaxseed. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.77, n.3, p.235-238, 2000.

- MANCINI-FILHO, J., VAN-KOIJ, A., MANCINI, D.A.P., COZZOLINO, F.F., TORRES, R.P. Antioxidant activity of cinnamon (*Cinnamomum Zeylanicum*, Breyne) extracts. **Boll. Chim Farmac.**, Milano, v.137, n.11, p.443-447, 1998.
- MANDELL, I.B., BUCHANAN-SMITH, J.G., HOLUB, B.J. Enrichment of beef with ω -3 fatty acids. **World Rev. Nutr. Diet.**, Basel, v.83, p.144-159, 1998.
- MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.45, p.594-598, 1968.
- MARSHALL, A.C., SAMS, A.R., VAN ELSWYK, M.E. Oxidative stability and sensory quality of stored eggs from hens fed 1,5% menhaden oil. **J. Food Sci.**, Chicago, v.59, n.3, p.561-563, 1994.
- MERCIER, Y., GATELLIER, P., VIAU, M., REMIGNON, H., RENERRE, M. Effect of dietary fat and vitamin E on colour stability and on lipid and protein oxidation in turkey meat during storage. **Meat Sci.**, Oxford, v.48, n.3/4, p.301-318, 1998.
- MEYDANI, S.N. Effect of (n-3) polyunsaturated fatty acids on cytokine production and their biologic function. **Nutrition**, New York, v.12, p.S8-S14, 1996.
- MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.45, p.91, 1971.
- MILOS, M., MASTELIC, J., JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). **Food Chem.**, Kidlington, v.71, p.79-83, 2000.
- MIRANDA, M.S., SATO, S., MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of the microalga *Chlorella vulgaris* cultered on special conditions. **Boll. Chim. Farmac.**, Milano, v.140, n.3, p.165-168, 2001.
- MORI, A.V. Utilização de óleo de peixe e linhaça na ração como fontes de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 em ovos de galinha. São Paulo, 2001. 162p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP).

- MOURE, A., CRUZ, J.M., FRANCO, D., DOMÍNGUEZ, J.M., SINEIRO, J., DOMÍNGUEZ, H., NÚÑEZ, M.J., PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chem.**, Kidlington, v.72, p.145-171, 2001.
- NAKATANI, N. Natural antioxidants from spices. In: HO, C.T., LEE, C.Y., HUANG, M.T., eds. **Phenolic compounds in food and their effects on health**. Washington: American Chemical Society, 1992. p.54-71. (ACS Symposium series, n.506).
- NAKATANI, N. Antioxidants from spices and herbs. In: SHAHIDI, F., ed. **Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications**. Champaign: AOCS Press, 1997. p.64-75.
- NAKATANI, N., KIKUZAKI, H. A new antioxidative glucoside isolated from oregano (*Origanum vulgare* L.). **Agric. Biol. Chem.**, v.51, n.10, p.2727-2732, 1987.
- NAM, K.T., LEE, H.A., MIN, B.S., KANG, C.W. Influence of dietary supplementation with linseed and vitamin E on fatty acids, α -tocopherol and lipid peroxidation in muscles of broiler chicks. **Anim. Feed Sci. Technol.**, Amsterdam, v.66, p.149-158, 1997.
- NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Lauderdale, v.29, n.4, p.273-300, 1990.
- NARDONE, A., VALFRÈ, F. Effects of changing production methods on quality of meat, milk and eggs. **Livest. Prod. Sci.**, Amsterdam, v.59, p.165-182, 1999.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Subcommittee on Poultry Nutrition. Committee on Animal Nutrition. **Nutrient requirements of poultry**. 9.ed. Washington: National Academy Press, 1994. 155p.
- NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. **Food chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p.225-319. (Food science and technology).
- OFFORD, E.A., GUILLOT, F., AESCHBACH, R., LÖLIGER, J., PFEIFER, A.M.A. Antioxidant and biological properties of rosemary components: implications for food and health. In: SHAHIDI, F., ed. **Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications**. Champaign: AOCS, Press, 1997. p.88-96.

- OH, S.Y., RYUE, J., HSIEH, C.H., BELL, D.E. Eggs enriched in ω -3 fatty acids and alterations in lipid concentrations in plasma and lipoproteins and in blood pressure. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.54, p.689-695, 1991.
- OOMAH, B.D., KENASCHUK, E.O., MAZZA, G. Phenolic acids in flaxseed. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.43, p.2016-2019, 1995.
- OOMAH, B.D., KENASCHUK, E.O., MAZZA, G. Tocopherols in flaxseed. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.45, p.2076-2080, 1997.
- PAPAS, A.M. Oil-soluble antioxidants in foods. **Toxicol. Ind. Health**, Letchworth, v.9, n.1/2, p.123-149, 1993.
- PAPAS, A.M. Diet and antioxidants status. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.37, p.999-1007, 1999.
- PONNAMPALAM, E.N., TROUT, G.R., SINCLAIR, A.J., EGAN, A.R., LEURY, B.J. Comparison of the color stability and lipid oxidative stability of fresh and vacuum packaged lamb muscle containing elevated omega-3 and omega-6 fatty acid levels from dietary manipulation. **Meat Sci.**, Oxford, v.58, p.151-161, 2001.
- PRASAD K. Dietary flax seed in prevention of hypercholesterolemic atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Shannon, v.132, p.69-76, 1997.
- PRASAD, K., MANTHA, S.V., MUIR, A.D., WESTCOTT, N.D. Reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by CDC-flaxseed with very low alpha-linolenic acid. **Atherosclerosis**, Shannon, v.136, p.367-375, 1998.
- PRATT, D.E. Natural antioxidants from plant material. In: HUANG, M.T., HO, C.T., LEE, C.Y. **Phenolic compounds in food and their effects on health**. Washington: American Chemical Society, 1992. p.54-71.
- QI, G.H., SIM, J.S. Natural tocopherol enrichment and its effect in n-3 fatty acid modified chicken eggs. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.46, p.1920-1926, 1998.
- RAMANATHAN, L., DAS, N.P. Studies on the control of lipid oxidation in ground fish by some polyphenolic natural products. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.40, p.17-21, 1992.

- RAMANATHAN, L., DAS, N.P. Natural products inhibit oxidative rancidity in salted cooked ground fish. **J. Food Sci.**, Chicago, v.58, n.2, p.318-320, 360, 1993.
- RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., BOLWELL, P.G., BRAMLEY, P.M., PRIDHAM, J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Res.**, Amsterdam, v.22, n.4, p.375-383, 1995.
- RICHARDSON, R.I. Vitamin E in poultrymeat. **Poult. Int.**, Mount Morris, nov., p.28-29, 1994.
- RICKARD, S.E., THOMPSON, L.U. Health effects of flaxseed mucilage, lignans. **Inform**, Champaign, v.8, n.8, p.860-865, 1997.
- ROSE, D.P., CONNOLLY, J.M., COLEMAN, M. Effect of omega-3 fatty acids on the progression of metastases after the surgical excision of human breast cancer cell solid tumors growing in nude mice. **Clin. Cancer Res.**, Birmingham, v.2, n.10, p.1751-1756, 1996.
- SALEM Jr., N. Introduction to polyunsaturated fatty acids. **Background**, v.3, n.1, p.1-8, 1999.
- SALEM Jr., N., SIMOPOULOS, A.P., GALLI, C., LAGARDE, M., KNAPP, H.R. Fatty acids and lipids from cell biology to human disease. **Lipids**, Champaign, v.31, suppl., p.S1-S326, 1996.
- SANT'ANA, L.S., MANCINI-FILHO, J. Ação antioxidante de extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em filés de peixes da espécie Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg). **Rev. Bras. Plant. Med.**, Botucatu, v.2, n.1, p.27-31, 1999.
- SHAHIDI, F., WANASUNDARA, P.K.J.P.D. Phenolic antioxidants. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Lauderdale, v.32, n.1, p.67-103, 1992.
- SHUKLA, V.K.S., WANASUNDARA, P.K.J.P.D., SHAHIDI, F. Natural antioxidants from oilseeds. In: SHAHIDI, F., ed. **Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications**. Champaign: AOCS Press, 1997. p.97-132.

- SILVA, F.A.M., BORGES, M.F.M., FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Quim. Nova**, São Paulo, v.22, n.1, p.94-103, 1999.
- SIM, J.S. Designer eggs and their nutritional and functional significance. **World Rev. Nutr. Diet.**, Basel, v.83, p.89-101, 1998.
- SIMOPOULOS, A.P. Redefining dietary reference values and food safety. **World Rev. Nutr. Diet.**, Basel, v.83, p.219-222, 1998.
- SIMOPOULOS, A.P. Symposium: role of poultry products in enriching the human diet with N-3 PUFA: human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. **Poult. Sci.**, Savoy, v.79, p.961-970, 2000.
- SIMOPOULOS, A.P., LEAF, A., SALEM Jr., N. Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. **Ann. Nutr. Metab.**, Basel, v.43, p.127-130, 1999.
- STOLL, B.A. Breast cancer and the western diet: role of fatty acids and antioxidant vitamins. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v.34, n.12, p.1852-1856, 1998.
- TANG, S., KERRY, J.P., SHEEHAN, D., BUCKLEY, D.J., MORRISSEY, P.A. Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. **Food Res. Int.**, Oxford, v.34, p.651-657, 2001.
- THOMAS, M.J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition**, New York, v.16, n.7/8, p.716-718, 2000.
- THOMPSON, L.U., RICKARD, S.E., ORCHESON, L.J., SEIDL, M.M. Flaxseed and its lignan and components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. **Carcinogenesis**, Oxford, v.17, p.1373-1376, 1996.
- TSALIKI, E., LAGOURI, V., DOXASTAKIS, G. Evaluation of the antioxidant activity of lupin seed flour and derivatives (*Lupinus albus* ssp. *Graecus*). **Food Chem.**, Kidlington, v.65, p.71-75, 1999.
- TSIMIDOU, M., BOSKOU, D. Antioxidant activity of essential oils from the plants of the Lamiaceae family. In: CHARALAMBOUS, G. Spices, herbs and edible fungi. Elsevier: Amsterdam, 1994. p.273-284. Apud: MILOS,

- M., MASTELIC, J., JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). **Food Chem.**, Kidlington, v.71, p.79-83, 2000.
- TURATTI, J.M. A importância dos ovos numa dieta saudável. **Óleos e grãos**, São Caetano do Sul, n.59, p.22-24, 2001.
- UAUY, R., VALENZUELA, A. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. **Nutrition**, New York, v.16, n.7/8, p.680-684, 2000.
- VAN ELSWYK, M.E. Comparison of n-3 fatty acid sources in laying hen rations for improvement of whole egg nutritional quality: a review. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.78, suppl.1, p.S61-S69, 1997.
- VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette-Seifen Anstrichmittel**, Hamburgo, v.72, n.12, p.1084-1087, 1970.
- WANASUNDARA, U.N., SHAHIDI, F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chem.**, Kidlington, v.63, n.3, p.335-342, 1998.
- WANASUNDARA, P.K.J.P.D., SHAHIDI, F., SHUKLA, V.K.S. Endogenous antioxidants from oilseeds and edible oils. **Food Rev. Int.**, v.13, n.2, p.225-292, 1997.
- WANG Y., SUNWOO H., CHERIAN G., SIM J.S. Fatty acid determination in chicken egg yolk: a comparison of different methods. **Poult. Sci.**, Savoy, v.79, p.1168-1171, 2000.
- WARNANTS, N., VAN OECKEL, M.J., BOUCQUÉ, Ch.V. Effect of incorporation of dietary polyunsaturated fatty acids in pork backfat on the quality of salami. **Meat Sci.**, Oxford, v.49, n.4, p.435-445, 1998.
- WEBBER, C., PODDA, M., RALLIS, M., THIELE, J.J., TRABER, G.M., PACKER, L. Efficacy of topically applied tocopherols and tocotrienols in protection of murine skin from oxidative damage induced by UV-irradiation. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.22, p.761-769, 1997.
- WETTASINGHE M., SHAHIDI F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. **Food Chem.**, Kidlington, v.67, p.399-414, 1999.

- WILDMAN, R.E.C. Nutraceuticals: a brief review of historical and teleological aspects. In: WILDMAN, R.E.C. **Handbook of nutraceuticals and functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p.1-12. (CRC series in modern nutrition).
- WINTERBOURN, C.C., GUTTERIDGE, J.M., HALLIWEL, B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. **J. Free Radical Biol. Med.**, New York, v.1, p.43-49, 1985.
- WISEMAN, H. Dietary influences on membrane function: importance in protection against oxidative damage and disease. **J. Nutr. Biochem.**, v.7, p.2-15, 1996.
- WOOD, J.D., ENSER, M. Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.78, suppl.1, p.S49-S60, 1997.
- WOODALL, A.A., BRITTON, G., JACKSON, M.J. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1336, p.575-586, 1997.
- XING, Y., WHITE, P.J. Identification and function of antioxidants from oat groats and hulls. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.74, n.3, p.303-307, 1997.
- YANISHLIEVA, N.V., MARINOVA, E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chem.**, Kidlington, v.54, p.377-382, 1995.
- YUAN, Y.V., RICKARD, S.E., THOMPSON, L.U. Short-term feeding of flaxseed or its lignan has minor influence on *in vivo* hepatic antioxidant status in young rats. **Nutr. Res.**, New York, v.19, n.8, 1233-1243, 1999.

Anexo 1. Teste de Diferença-do-Controle ou Comparação Múltipla.

Nome: _____ Data: ___/___/___

Por favor, você está recebendo amostras de gemas de ovos, avalie primeiro a amostra-padrão (P) e depois as três amostras-teste codificadas. Utilizando a escala abaixo indique o quanto cada amostra difere, **em termos globais**, da amostra-padrão.

- 0 = nenhuma diferença de P
- 1
- 2 = ligeiramente diferente de P
- 3
- 4 = moderadamente diferente de P
- 5
- 6 = muito diferente de P
- 7
- 8 = extremamente diferente de p

Aparência	Amostra	Grau de diferença
	_____	_____
	_____	_____
	_____	_____

Odor / Aroma:	Amostra	Grau de diferença
	_____	_____
	_____	_____
	_____	_____

Sabor:	Amostra	Grau de diferença
	_____	_____
	_____	_____
	_____	_____

Comentários: _____

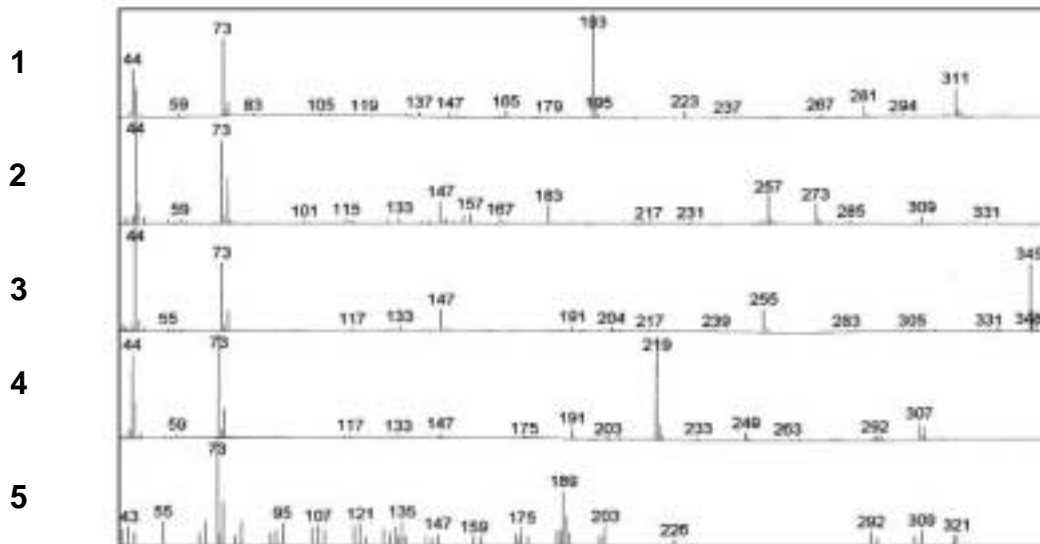
Anexo 2. Escala não estruturada para avaliação da cor amarela.

Nome: _____ Data: ___/___/___

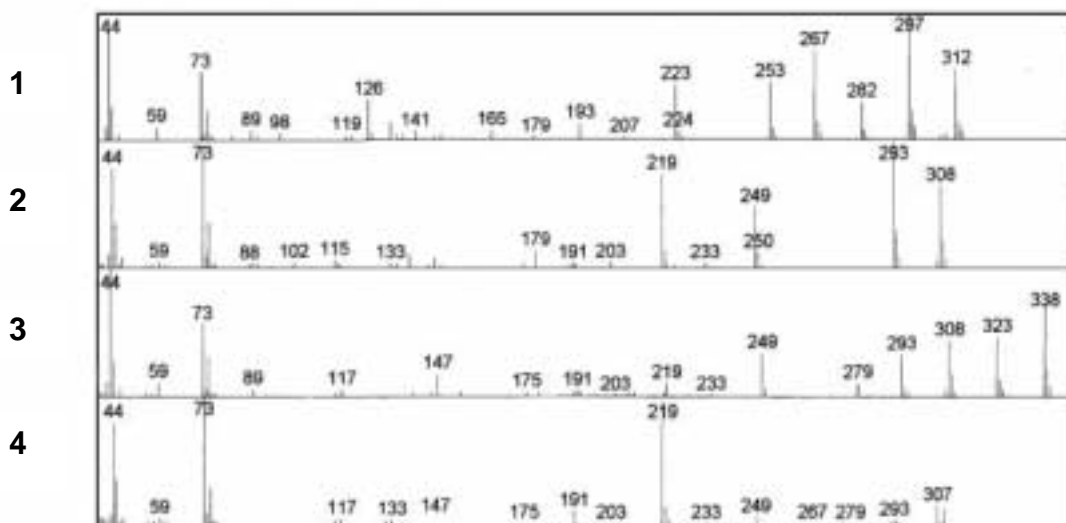
Por favor, indique a intensidade da cor amarela das amostras de gemas de ovos e coloque um traço vertical na linha entre **clara** e **escura**.

Cor _____ amarela
|
_____ clara
|
_____ escura

Obrigada!



Anexo 3. Espectros de massa dos ácidos fenólicos na fração solúvel do orégano (1, protocatequínico; 2, quínico; 3, - quínico; 4, caféico; 5, clorogênico)



Anexo 4. Espectros de massa dos ácidos fenólicos na fração solúvel do alecrim (1, vanílico; 2, p-cumárico; 3, ferúlico; 4, caféico)