

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

**Modelagem matemática na avaliação do sinergismo da atividade
antioxidante de compostos naturais aplicados em emulsões
alimentícias**

Caroline Dário Capitani

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof^a Dr^a Inar Alves de Castro

1950
São Paulo
2009

DEDALUS - Acervo - CQ



30100015692

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Capitani, Caroline Dário

C244m Modelagem matemática na avaliação do sinergismo da
atividade antioxidante de compostos naturais aplicados em
emulsões alimentícias / Caroline Dário Capitani. - São
Paulo, 2009.

107p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos
e Nutrição Experimental

Orientador: Castro, Inar Alves de

1. Antioxidante : Ciência dos alimentos 2. Estatística
aplicada a tecnologia de alimentos I. T. II. Castro, Inar
Alves de, orientador.

641.19 CDD

Caroline Dário Capitani

**Modelagem matemática na avaliação do sinergismo da atividade
antioxidante de compostos naturais aplicados em emulsões
alimentícias**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a Dr^a Inar Alves de Castro
(Orientadora / Presidente)

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

4° Examinador

defesa: 04-09-2009
São Paulo, _____ de _____.

“...gratidão é a única palavra para expressar o reconhecimento do amor verdadeiro e incondicional...”

...à minha mãe Ana Maria e ao meu pai Luiz Roberto

Dedico

“Confia no Senhor e faze o bem...

Deleita-te também no Senhor, e te concederá os desejos do seu coração.

Entrega o teu caminho ao Senhor; confia Nele e Ele o fará”.

Salmo 37(2,5)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Agradeço especialmente a **Profª Drª Inar Alves de Castro** por ter aceitado esse desafio e pelo competente trabalho durante a orientação deste trabalho.*

*À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF / USP**, especialmente ao **Departamento de Ciência dos Alimentos** pela oportunidade profissional e pessoal.*

*À **FAPESP** pelo financiamento do projeto.*

*A **Kraki** - Kienast & Kratschmer Ltda. pela concessão da Planta Piloto.*

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** pelas bênçãos, sabedoria e paciência em todos os momentos desta vida.

A minha **família**, pai, mãe, Daniel e Raphael, por serem sempre peças fundamentais na construção da minha história.

Agradeço especialmente às minhas queridas amigas e estagiárias **Ana Carolina Lima de Carvalho (Carolzinha)** e **Cristina Meyer (Cris)** pelo auxílio imprescindível nas análises, pela amizade verdadeira e pela rica experiência de nossa convivência.

Às minhas amigas **Marliz Medina, Luciene Lauer** e **Patrícia Borges Botelho** pela amizade e pelo carinho com que sempre me ajudaram....

À todos os amigos do laboratório: **Joana, Mariana, Cynthia, Vitor, Natália, Luz, Claudia, Daniel, Gabriel e Michele** pela excelente convivência e aprendizado.

À Profa. Dra. **Célia Colli** e à todos os **alunos do seu grupo** (em especial à amiga **Luciana Setaro**), pela amizade e por me apoiarem nos momentos especiais...

A todos os **voluntários** (provadores) que se dispuseram a participar da análise sensorial.

Ao **Diogo Rivelli** e à profa. Dra. **Silvia Berlanga** pela ajuda imprescindível no método ORAC.

Ao **Alexandre Mariano** pelo auxílio nas análises de textura.

Aos **professores membros da banca**, pelas sugestões e contribuições apresentadas.

Ao **Jorge, Elaine e Majô**, sempre dispostos em atender às minhas dúvidas.

Aos funcionários do B14, **Edilson, Cléo** e **Mônica** pelo auxílio e paciência em todas as horas.

Às amigas **Analúcia** e **Denise** pelo "teto" aconchegante, pelas longas conversas e pela sincera amizade, sempre...

Aos amigos (mais que especiais) que sempre me apoiaram: **Andressa, Sandra, Cotrim e Natália.**

À **todos os amigos que nasceram** nesta etapa, aos **colegas de trabalho** e àqueles que de uma maneira ou de outra sempre me incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho;

Meus mais sinceros agradecimentos...

Caroline

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
I- INTRODUÇÃO	01
1.1 Oxidação lipídica	01
1.2 Antioxidantes	03
1.3 Classificação e mecanismo de ação dos antioxidantes	06
1.4 Métodos de avaliação da atividade antioxidante	12
1.5 Avaliação do grau de oxidação lipídica	16
1.6 Uso de planejamentos fatoriais e análise multivariada na avaliação da atividade antioxidante de diferentes compostos naturais	18
II- OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
CAPÍTULO 1	21
Resumo	21
1. Introdução	22
2. Materiais e Métodos	24
2.1 Antioxidantes	24
2.2 Reagentes	25
2.3 Preparo das soluções	25
2.4 Determinação da atividade antioxidante dos compostos pelo método DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil)	26
2.5 Peroxidação do ácido linoléico induzida pelo azo-iniciador 2,2'-azobis-methylpropionamide)dihydrochloride (AAPH) – LAOX	26
2.6 Determinação de TBARS (<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>) em homogenato preparado a base de carne de frango	27

2.7 Avaliação do potencial antioxidante in vitro pelo método ORAC (<i>Oxygen radical absorbance capacity assay</i>)	28
2.8 Capacidade redutora do Fe ⁺³ / Poder antioxidante (<i>Ferric reducing ability</i>)	29
2.9 Análise estatística aplicada a primeira fase da pesquisa	30
3. Resultados e Discussão	31
3.1 Análise unidimensional	31
3.2 Análise multi-dimensional	36
4. Conclusões	41
CAPÍTULO 2	42
Resumo	42
1. Introdução	43
2. Materiais e Métodos	45
2.1 Reagentes	45
2.2 Preparo das soluções e das misturas	45
2.3 Avaliação da atividade antioxidante em diferentes métodos	46
2.4 Análise estatística	47
3. Resultados	48
4. Discussão	60
5. Conclusões	62
CAPÍTULO 3	63
Resumo	63
1. Introdução	64
2. Materiais e Métodos	67
2.1 Matéria-prima e produção das salsichas	67
2.2 Análises químicas	72
2.3 Análise de cor (amostras cruas)	73
2.4 Análise de textura (amostras cruas e cozidas)	74
2.5 Parâmetros de oxidação lipídica (amostras cruas e cozidas)	75

2.6 Análise microbiológica (amostras cruas)	79
3. Resultados	81
3.1 Composição centesimal	81
3.2 Atividade de água (aw).....	82
3.3 Valores de pH	83
3.4 Análise microbiológica	84
3.5 Análise de cor	85
3.6 Parâmetros de textura	87
3.7 Análise sensorial	89
3.8 Resultados de TBARS expressos em mg MDA/Kg de amostra	90
4. Discussão	91
5. Conclusões	97
REFERÊNCIAS	98
ANEXOS	108

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Principais etapas da oxidação lipídica (modificado de Carlsen et al., 2005)	01
Figura 2. Estrutura molecular de alguns antioxidantes artificiais (BHT, BHA, PG, TBHQ, Eritorbato de sódio e EDTA) (modificado de Halliwell & Gutteridge, 2004; Frankel, 2005).....	04
Figura 3. Estrutura molecular de alguns compostos naturais extraídos de fontes alimentares (modificado de Surh, 2003)	05
Figura 4. Natureza química do ácido ascórbico e do ácido dehidroascórbico (modificado de WRISTA et al., 2003)	07
Figura 5. Estrutura molecular do α -tocoferol (modificado de Halliwell & Gutteridge, 2004; Frankel, 2005)	08
Figura 6. Principais classes dos flavonóides e flavonóides classificados como catequinas e cianidanol (modificado de Denisov & Afanas'Ev, 2005)	09
Figura 7. Estrutura básica dos flavonóides e de alguns antioxidantes flavonóides (modificado de Frankel, 2005)	10
Figura 8. Estrutura molecular dos antioxidantes resveratrol, ácido carnósico e ácido cafeico (modificado de Halliwell & Gutteridge, 2004)	12

CAPÍTULO 1

Figura 1. Curvas de cinética de decaimento dos compostos analisados pelo método DPPH. Valores expressos com média (n=3).	33
Figura 2. Análise de cluster aplicada.....	37
Figura 3. Projeção dos casos no plano factorial (1 x 2). Variáveis ativas: DPPH, FRAP, ORAC, LAOX e TBARS, número de hidroxilas (OH), número de anéis fenólicos e peso molecular (PM).	38
Figura 4. Estrutura molecular dos compostos pertencentes ao Cluster II (CAF-ácido cafeico; GEN-genisteína; CARN-ácido carnósico; RES-resveratrol.....	40

CAPÍTULO 2

Figura 1. Curva de contorno ilustrando o efeito das proporções e atividade antioxidante do ácido cafeico (CAF), ácido carnósico (CARN) e glutathione (GLU) avaliadas a partir de inibição da oxidação utilizando-se micelas preparadas com ácido linoléico (método LAOX), expresso em Trolox equivalente (mmol/L TE)	53
Figura 2. Gráficos dos valores previstos e desejáveis de atividade antioxidante avaliada pela inibição da oxidação utilizando micelas preparadas com ácido linoléico (método LAOX), expresso em Trolox equivalente (mmol/L TE), baseando-se nas misturas contendo ácido cafeico (CAF), ácido carnósico (CAR) e glutathione (GLU).	54
Figura 3. Curva de contorno ilustrando o efeito das diferentes proporções de quercetina (QUE), rutina (RUT) e genisteína (GEN) avaliadas pelo método FRAP, expressos em Trolox equivalente (mmol/L TE).	56

Figura 4. Gráficos dos valores previstos e desejáveis de atividade antioxidante avaliada pelo método FRAP e expresso em Trolox equivalente (mmol/L TE), baseando-se nas misturas contendo quercetina (QUE), rutina (RUT) e genisteína (GEN).....	57
Figura 5. Estrutura molecular dos compostos utilizados para preparo das misturas hidrossolúveis e lipossolúveis	61
CAPÍTULO 3	
Figura 1. Etapas do processamento da salsicha tipo <i>hot-dog</i>	72
Figura 2. Representação de coordenadas sistema L^* , a^* e b^* para avaliação de cor instrumental (PRECISE, 1994)	74
Figura 3. Concentração de TBARS expressos em MDA (mg/Kg amostra) de salsichas cozidas em solução de sulfato ferroso (0 a 0.1%).	77
Figura 4. Valores médios de atividade de água (a_w) das salsichas durante 45 dias ($n=3$). Barras seguidas de letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os intervalos de tempo ($p>0.01$)	82
Figura 5. Valores de pH das amostras de salsichas elaboradas com eritorbato de sódio (CT), com antioxidantes hidrossolúveis (H500 e H800) e com antioxidantes lipossolúveis (L500 e L800) armazenadas a 4°C durante 45 dias ($n=2$). Valores de probabilidade determinados através da ANOVA para MR: amostras ($p<0.01$), tempo ($p<0.01$) e interação amostra vs. tempo ($p=0.64$). Amostras seguidas da mesma letra (minúscula) e tempos seguidos da mesma letra (maiúscula) não apresentam diferença significativa ($p>0.01$) entre as médias de todos os resultados nesse período.	83
Figura 6. Valores médios de L^* das amostras nos diferentes intervalos de tempo ($n=3$). Valores de probabilidade determinados através da ANOVA MR: amostra ($p<0.01$) e interação tempo vs. amostra ($p<0.01$). Barras seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa ($p>0.01$).	85
Figura 7. Valores médios de a^* das amostras nos diferentes intervalos de tempo ($n=3$). Valores de probabilidade determinados através da ANOVA MR: amostra ($p<0.01$) e interação tempo vs. amostra ($p<0.01$). Barras seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa ($p>0.01$).	86
Figuras 8. Valores b^* das salsichas controle (CT), com antioxidantes hidrossolúveis (H500 e H800) e lipossolúveis (L500 e L800) armazenadas a 4°C durante 45 dias ($n=3$). Valores de probabilidade determinados através da ANOVA MR: amostra ($p<0.01$), tempo ($p<0.01$) e interação tempo vs. amostra ($p<0.01$). Amostras seguidas da mesma letra (minúscula) e tempos seguidos da mesma letra (maiúscula) não apresentam diferença significativa ($p>0.01$).	87
Figura 9. Valores de dureza (N) das salsichas cruas elaboradas com eritorbato de sódio (CT), com antioxidantes hidrossolúveis (H500 e H800) e lipossolúveis (L500 e L800) armazenadas a 4°C por 45 dias ($n=5$). Valores de probabilidade determinados através da ANOVA MR: amostra ($p<0.01$), tempo ($p<0.01$) e interação tempo vs. amostra ($p<0.01$). Amostras seguidas da mesma letra (minúscula) e tempos seguidos da mesma letra (maiúscula) não apresentam diferença significativa ($p>0.01$).	88
Figura 10. Valores de dureza (N) das salsichas cozidas elaboradas com eritorbato de sódio (CT), com antioxidantes hidrossolúveis (H500 e H800) e lipossolúveis (L500 e L800) armazenadas a 4°C por 45 dias ($n=5$). Valores de probabilidade determinados através da ANOVA MR: amostra ($p<0.01$), tempo ($p<0.01$) e interação tempo vs. amostra ($p<0.01$). Amostras seguidas da mesma letra (minúscula) e tempos seguidos da mesma letra (maiúscula) não apresentam diferença significativa ($p>0.01$).	88

- Figura 11.** Valores médios dos resultados da análise sensorial a partir do teste de Diferença Escalar do Controle (DEC) das salsichas com antioxidantes hidrossolúveis (H500 e H800) e lipossolúveis (L500 e L800) vs. controle (CT) (n=20, média \pm DP). Valores de probabilidade determinados através da ANOVA MR: amostra ($p < 0.01$). Barras seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa ($p > 0.01$). 89
- Figura 12.** Variação da concentração de TBARS (expressa como mg MDA/Kg amostra) nas salsichas cozidas elaboradas com eritorbato de sódio (CT), com antioxidantes hidrossolúveis (H500 e H800) e lipossolúveis (L500 e L800) armazenadas a 4°C durante 45 dias (n=3). Valores de probabilidade determinados através da ANOVA MR: amostra ($p < 0.01$), tempo ($p < 0.01$) e interação tempo vs. amostra ($p < 0.01$). Amostras seguidas da mesma letra (minúscula) e tempos seguidos da mesma letra (maiúscula) não apresentam diferença significativa ($p > 0.01$). 90
- Figura 13.** Modificações químicas da miogloblina durante as reações do processo de cura (adaptado de Judge, 1975). 93

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1. Principais mecanismos envolvidos na avaliação da atividade antioxidante de acordo com o método aplicado	13
Tabela 2. Principais mecanismos envolvidos na avaliação da atividade antioxidante de acordo com o método aplicado	15
Tabela 3. Métodos de extensão oxidativa em amostras de alimento.....	17

CAPÍTULO 1

Tabela 1 Atividade antioxidante das amostras avaliadas a partir de diferentes metodologias <i>in vitro</i> e expressa como Trolox equivalente (TE) ^f	34
Tabela 2. Correlação das variáveis fatoriais baseadas na correlação entre elas.	38
Tabela 3. Atividade antioxidante dos compostos classificados pela análise de Cluster avaliados por diferentes metodologias <i>in vitro</i> expressos em Trolox equivalente (TE)	39

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Delineamento experimental " <i>centróide simplex</i> " utilizado na avaliação das misturas hidrossolúvel e lipossolúvel.	46
Tabela 2. Desenho experimental " <i>centroide simplex</i> " para as amostras hidrossolúveis e respectivos valores de atividade antioxidante expressos em Trolox equivalente (mmol/L ou $\mu\text{mol/L TE}$)	49
Tabela 3. Desenho experimental " <i>centroid simplex</i> " para as amostras lipossolúveis e respectivos valores de atividade antioxidante expressos em Trolox equivalente (mmol/L ou $\mu\text{mol/L TE}$)	50
Tabela 4. Coeficientes dos modelos polinomiais ($\pm\text{SE}$) para amostras hidrossolúveis e avaliação da qualidade do ajuste do modelo	51
Tabela 5. Coeficientes dos modelos polinomiais ($\pm\text{SE}$) para amostras lipossolúveis e avaliação da qualidade do ajuste do modelo	55

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Formulação das amostras de salsichas (g/100g).	69
Tabela 2. Composição centesimal dos ingredientes utilizados na elaboração das salsichas e modelo de cálculo com base na formulação CT.	70
Tabela 3. Valores de probabilidade (<i>p</i>) obtidos por ANOVA para amostra e repetibilidade nas análises sensoriais após treinamento	78
Tabela 4. Teor de cinzas, proteínas e lipídeos (g/100g) das matérias-primas utilizadas para produção das salsichas (média \pm DP)	81
Tabela 5. Teor de cinzas, proteínas e lipídeos (g/100g) das amostras de salsichas (média \pm DP)	82
Tabela 6. Contagem de bactérias lácticas, expresso em UFC/g nas diferentes amostras de salsichas armazenadas a 4°C durante 60 dias (n=2)	84

LISTA DE ABREVIATURAS

% DPPHr – percentual de DPPH remanescente

$^1\text{O}_2$ – oxigênio singlete

$^3\text{O}_2$ – oxigênio triplete

aw – atividade de água

A $^\bullet$ – antioxidante radical

AAPH – 2,2'azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride

AH – antioxidante

AH $^\bullet$ – antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo

BHA – butildihidroxianisola

CARN – ácido carnósico

CAF – ácido cafeico

DEC – diferença escalar do controle

DMF – dimetilformamida

DPPH - 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil

EDTA - ácido etileno diamino tetracético

Emulsão A/O – emulsão água em óleo

Emulsão O/A – emulsão óleo em água

EH - eritorbato de sódio

E $^\bullet$ - eritorbato radical.

Fe $^{+2}$ – íon ferroso

Fe $^{+3}$ – íon férrico

FRAP - *ferric reducing antioxidant power*

GEN - genisteína

GLU – glutationa

H - hidrogênio

HNO $_2$ – ácido nitroso

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

L $^\bullet$ – ácido graxo radical

LAOX – *linoleic acid oxidation*

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

LH – ácido graxo insaturado

LL – produtos secundários não radicais

LOO $^\bullet$ – radical peróxido

LOOH – hidroperóxidos

MA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDA - malondialdeído
TAH – transferência de átomos de hidrogênio
TE – transferência de elétrons
MSR - metodologia de superfície de resposta
NaNO₂ – nitrito de sódio
NaNO₃ – nitrato de sódio
NO – óxido nítrico
O₂ - oxigênio
OH – grupamento hidroxila
ORAC - *oxygen radical absorbance capacity*
PCA – análise em componentes principais
PG - galato de propila
QUE - quercetina
R• – radical livre
RUT - rutina
TBA – ácido tiobarbitúrico
TBHQ - terc-butil hidroquinona
BHT - butildihidroxi tolueno
TCA – ácido tricloroacético
TE – trolox equivalente
TG – triacilglicerol
TPTZ – 2,4,6-tripyridyl-s-triazine
VP – valor de peróxido

C/M

CAPITANI, C.D. **Modelagem matemática na avaliação do sinergismo da atividade antioxidante de compostos naturais aplicados em emulsões alimentícias**. 2009. 110P. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2009.

RESUMO

O crescimento do mercado de alimentos funcionais e orgânicos, assim como a maior conscientização do consumidor em relação aos efeitos tóxicos e mutagênicos de alguns aditivos artificiais, tem impulsionado a indústria a substituir compostos artificiais por naturais. Emulsões alimentícias, como salsichas e maionese, são sistemas bifásicos altamente suscetíveis às reações de oxidação lipídica responsável pela degradação da coloração dos produtos e formação de *off-flavors* desagradáveis. Para retardar ou inibir a oxidação e aumentar o *shelf life* das emulsões, a indústria alimentícia faz uso de compostos sintéticos artificiais. Desta forma, o objetivo deste estudo foi de, inicialmente, avaliar a atividade antioxidante de vinte e dois compostos (artificiais e naturais), classificando-os de acordo com a atividade antioxidante determinada através de cinco diferentes metodologias *in vitro*. As amostras foram classificadas em três *clusters* de acordo com os resultados expressos como equivalentes de trolox (TE) observados nos diferentes métodos. A aplicação das técnicas estatísticas multivariadas sugeriu que dentre os compostos que apresentaram maior atividade antioxidante, a partir dos métodos DPPH, FRAP, TBARS e ORAC, foram ácido cafeico, ácido carnósico, genisteína e resveratrol. Essa propriedade apresentou correlação significativa com o número de anéis fenólicos e estrutura catecólica presentes nessas moléculas. Baseando-se nessa classificação, e na hipótese de interações positivas para a resposta antioxidante foram selecionados três compostos hidrossolúveis (ácido cafeico, ácido carnósico e glutatona) e três lipossolúveis (quercetina, rutina e genisteína) para composição de duas misturas. A proporção de cada composto foi otimizada a partir da metodologia de superfície de resposta (MSR) avaliando-se a atividade antioxidante por três metodologias *in vitro*. A otimização do modelo polinomial sugeriu que as misturas contendo 47% de ácido cafeico e 53% de ácido carnósico ou 67% de quercetina e 33% de rutina apresentaram sinergismo, tornando essas combinações potencialmente interessantes para futura aplicação em matrizes alimentícias. A efetividade antioxidante das misturas otimizadas em relação a um composto artificial foi avaliada em uma emulsão alimentícia (salsicha) na proporção 500 e 800 mg/Kg. Ambas misturas (hidro e lipossolúveis) em ambas dosagens apresentaram menores concentrações de TBARS que a amostra formulada com o eritorbato de sódio durante o *shelf life*. Considerando-se o resultado da análise sensorial como critério de viabilidade, a mistura quercetina + rutina (500 mg/Kg), apresentou-se como melhor alternativa de substituição do eritorbato de sódio na formulação de salsichas tipo *hot dog*.

Palavras-chave: antioxidantes, emulsões, MDA, componentes principais, superfície de resposta.

CAPITANI, C.D. **Synergism on antioxidant activity between natural compounds evaluated by mathematical models.** 2009. 110P. Pharmaceutical Science School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, 2009.

ABSTRACT

The growth of the functional and organic food market combined with customer awareness about the toxicological and mutagenic effects observed in some artificial additives have stimulated the companies to replace artificial with natural compounds in the food formulation. Emulsions are biphasic systems that are highly susceptible to lipid oxidation which is able to cause damage to the color of products and the formation of undesirable bad flavors. In order to retard or inhibit the oxidation and extend the emulsions shelf-life companies have applied synthetic artificial compounds. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antioxidant activity of twenty two compounds (artificial and natural) and classify them according to their antioxidant activity as measured by five different *in vitro* methodologies. The samples were classified into three clusters in function of their antioxidant activity expressed as Trolox equivalents (TE). The application of multivariate statistical techniques suggested that caffeic acid, carnosic acid, genistein and resveratrol showed greater antioxidant activity when evaluated by DPPH, FRAP, TBARS and ORAC methodologies. The antioxidant activity of these compounds showed a significant positive correlation with the number of phenolic rings and catechol structures present in these molecules. Three hydrosoluble compounds (caffeic acid, carnosic acid and glutathione) and three liposoluble compounds (quercetin, rutin and genistein) were selected to prepare two assays based on the multivariate classification and on the hypothesis of positive interactions to the antioxidant response. The proportion of each compound in the mixture was optimized by the response surface methodology (RSM) on the results obtained from three *in vitro* methodologies. The optimization of the polynomial models suggested that mixtures containing 47% caffeic acid and 53% carnosic acid, or 67% quercetin and 33% rutin showed synergism making these mixtures potentially viable solutions for applications in the food matrix. The antioxidant effectiveness of the optimized mixtures compared to an artificial compound was evaluated in the food emulsion (sausages) in two dosages (500 and 800 mg/Kg). Both mixtures (hydrosoluble and liposoluble) in both dosages, promoted lower TBARS concentration than the sample formulated with sodium erythorbate during a shelf-life of 45 days under refrigeration. However, using into sensory results as selection criteria, the mixture containing quercetin and rutin at dosage of 500 mg/kg, proved to be the best alternative to replace sodium erythorbate in the sausage formulations.

Keywords: antioxidants, emulsion, MDA, principal components, response surface methodology.

I. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Oxidação lipídica

A oxidação lipídica é uma reação que leva a alterações na cor, no sabor e no odor (*off-flavor*) dos alimentos e, conseqüentemente, produz compostos potencialmente tóxicos para o organismo humano (PEÑA-RAMOS & XIONG, 2003; ALAMED et al., 2009). O processo de oxidação lipídica em alimentos pode ocorrer de diferentes formas conforme apresentado na **Figura 1**: (I) reação dos lipídeos com diferentes espécies reativas (O_2 , metais, etc.), (II) formação de peróxidos lipídicos por ação enzimática (atividade da lipoxigenase) ou (III) fotoxidação (CARLSEN et al., 2005; FRANKEL, 2005).

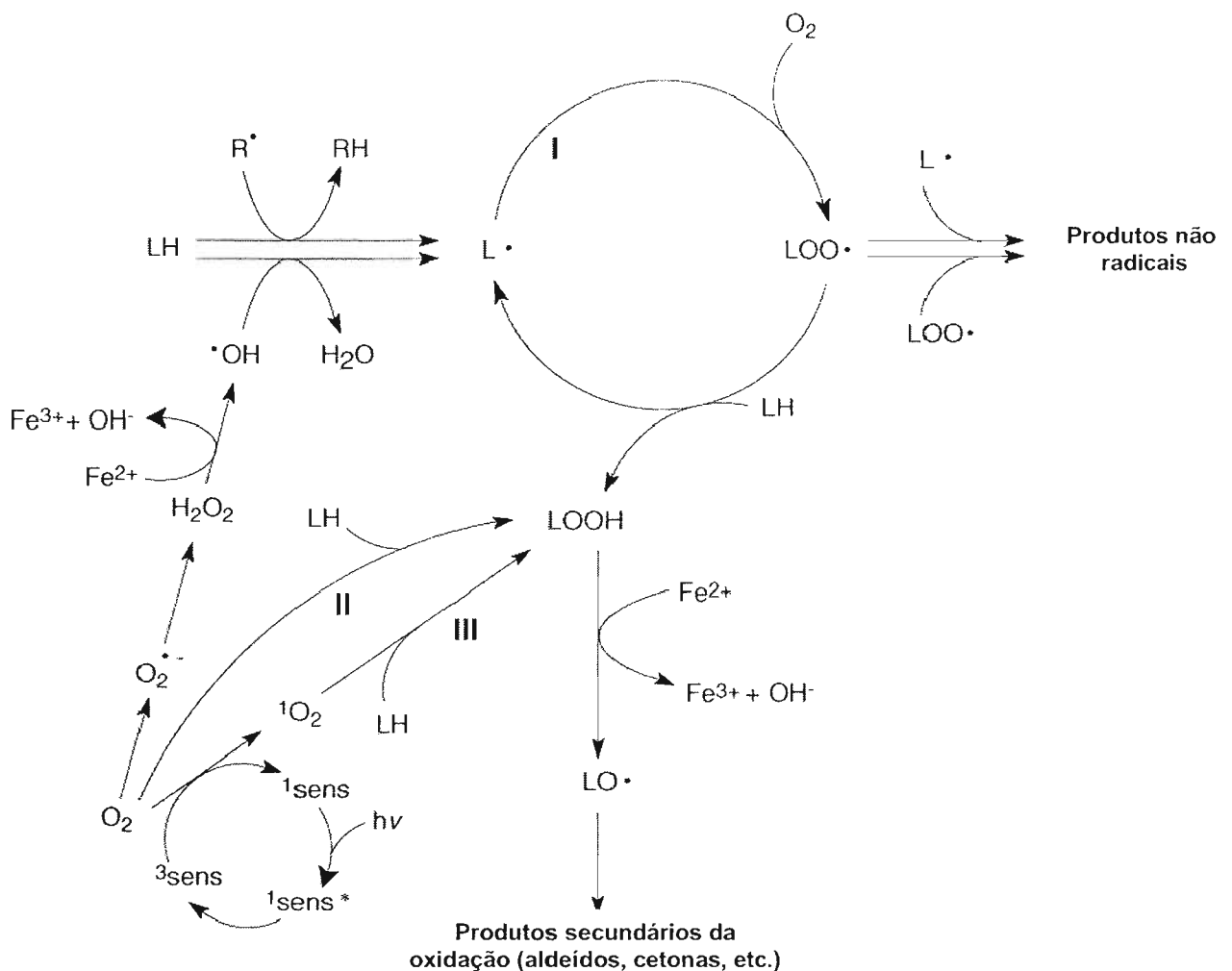
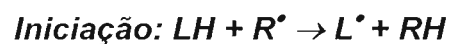


Figura 1. Principais etapas da oxidação lipídica (modificado de Carlsen et al., 2005). onde: **LH** – Ácido graxo insaturado; **R•** - Radical livre; **L•** - Ácido graxo radical; **LOO•** - Radical peróxido; **LOOH** – Hidroperóxidos, **LL** e **LOOL** – Produtos secundários não radicais; **•OH** – Radical hidroxila; **¹O₂** - Oxigênio singleto

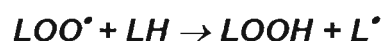
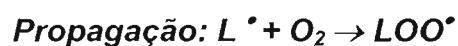
A autoxidação (Etapa I da **Figura 1**) é o principal mecanismo de oxidação lipídica em alimentos, no qual ocorre a reação do oxigênio (O_2), ou outros radicais oxidantes com ácidos graxos (LH), envolvendo três etapas: iniciação, propagação e terminação, conforme descrito por Frankel (2005). Como a reação inicial do O_2 com o ácido graxo é termodinamicamente difícil, a produção de radical, na etapa de iniciação é, em geral, catalisada por metais, por exposição à luz ou, ainda, pela reação com 1O_2 (FRANKEL, 2005).

Resumidamente, as três etapas da autoxidação podem ser descritas como:

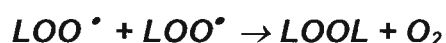
- Iniciação: formação de radicais dos ácidos graxos ao retirar um hidrogênio do carbono alílico, em condições favorecidas por luz, presença de metais ou calor (FRANKEL, 2005).



- Propagação: os radicais lipídicos (L^{\bullet}) formados na iniciação são suscetíveis ao ataque de oxigênio atmosférico sendo convertidos a outros radicais, formando peróxidos e hidroperóxidos. Esses produtos primários da oxidação atuam como propagadores da reação resultando num processo que se auto-alimenta até o final do substrato (FRANKEL, 2005).



- Terminação: ocorre a combinação de dois radicais através de cisão ou rearranjo dos peróxidos, formando produtos secundários estáveis (FRANKEL, 2005).



onde: **LH** – Ácido graxo instaurado; **R[•]** - Radical livre; **L[•]** - Ácido graxo radical; **LOO[•]** - Radical peróxido; **LOOH** – Hidroperóxidos, **LL** e **LOOL** – Produtos secundários não radicais.

A oxidação enzimática em alimentos pode também ocorrer pela ação das lipoxigenases que catalisam a adição de oxigênio à cadeia poliinsaturada, formando peróxidos e hidroperóxidos (Etapa II da **Figura 1**). A presença de luz ou raios ultravioleta (UV) na presença de fotossensibilizadores promove a fotoxidação (Etapa III da **Figura 1**). Nessa reação, ocorre alteração na camada de elétrons do oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) gerando o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o qual reage diretamente com as duplas ligações de ácidos graxos formando hidroperóxidos (RAMALHO & JORGE, 2006; FRANKEL, 2005).

Sendo assim, para controle dessas reações de oxidação em alimentos, existem diferentes técnicas de processamento e de embalagem que minimizam o contato do produto com O_2 , contribuindo, assim, para redução da taxa de oxidação lipídica. Além disso, o uso de agentes químicos apropriados como antioxidantes têm como finalidade retardar ou inibir esse processo (FENNEMA, 1996, ALAMED et al., 2009), aumentando a vida útil dos produtos.

1.2 Antioxidantes

Resumidamente, os antioxidantes são compostos naturais ou artificiais que têm como função inibir a oxidação lipídica (ALAMED et al., 2009) e podem ser definidos como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações, quando comparada a do substrato oxidável, retarda ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz”, a partir de diferentes mecanismos de ação (SIES & STAHL, 1995; RAMALHO & JORGE, 2006; JORGE & GONÇALVES, 1998; LAGUERRE et al., 2007).

Os antioxidantes artificiais mais usados pela indústria alimentícia são BHA (butildihidroxianisola), BHT (butildihidroxi tolueno), PG (galato de propila), TBHQ (terc-butil hidroquinona), eritorbato de sódio e EDTA (ácido etileno diamino tetracético) (**Figura 2**). A estrutura fenólica, de alguns desses compostos, permite a doação de um elétron a um radical livre formando radicais antioxidantes pouco reativos ou estáveis (FRANKEL, 2005; RAMALHO & JORGE, 2006). No entanto, apesar da eficiência da utilização desses antioxidantes artificiais em alimentos, estudos toxicológicos têm demonstrado efeito carcinogênico e hiperplasia intestinal em ratos que receberam diferentes doses desses compostos (BOTTERWECK et al.,

2000). O TBHQ, por exemplo, não é permitido no Canadá e na Comunidade Européia (SEBRANEK et al., 2005) e no Brasil, o Ministério da Saúde limita o uso de BHA, BHT e galato de propila (PG) em 100 mg/Kg (0.01g/100g) como concentração máxima no alimento, precisamente em embutidos frescos e congelados. Todavia, não existe limite máximo de adição para o eritorbato de sódio em produtos cárneos (BRASIL, 2007).

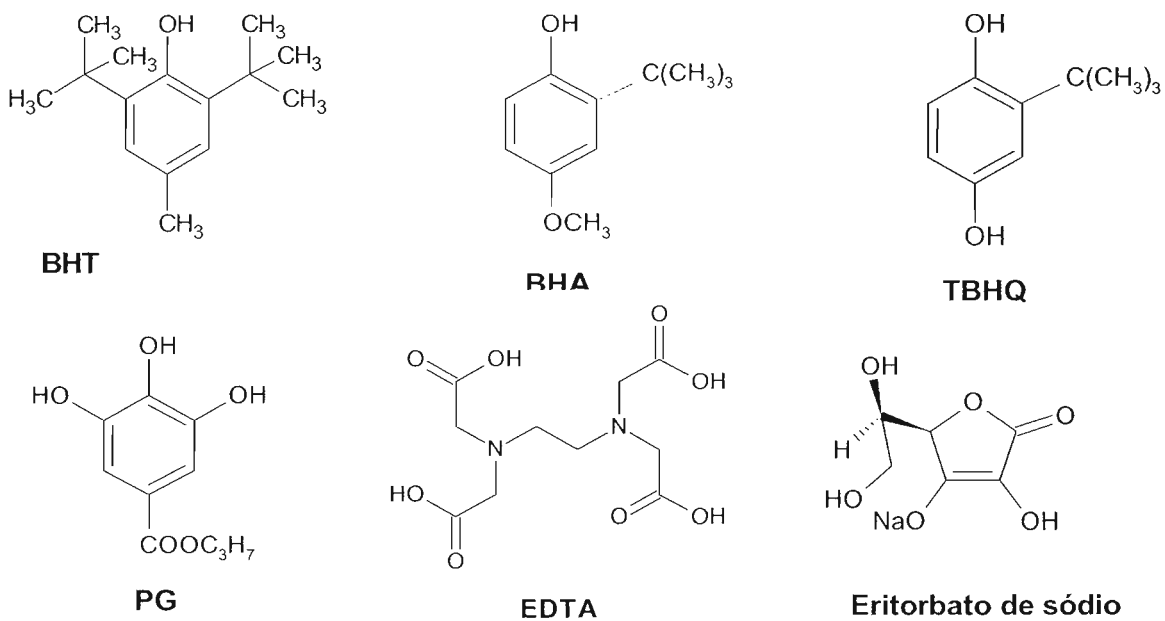


Figura 2. Estrutura molecular de alguns antioxidantes artificiais (BHT, BHA, PG, TBHQ, Eritorbato de sódio e EDTA) (modificado de HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2004; FRANKEL, 2005).

Sendo assim, o uso de antioxidantes naturais pode ser mais vantajoso do que o uso de artificiais, pois além de aumentar o tempo de vida útil ou *shelf life* de produtos industrializados, podem fornecer compostos bioativos benéficos à saúde humana. Exemplos clássicos são compostos extraídos diretamente de alimentos, tais como o resveratrol encontrado nas uvas e no vinho tinto, catequinas e outros flavonóides do chá verde e compostos fenólicos de frutas e de vegetais que atuam como antioxidantes naturais (CASTRO et al., 2005; RÓZEK et al., 2007). As estruturas moleculares de alguns compostos antioxidantes extraídos de fontes alimentares encontram-se descritas na **Figura 3**.

Sabendo-se que a população vem buscando alimentos com menor teor de aditivos e com apelo funcional agregado, a adição de compostos antioxidantes naturais em alimentos industrializados pode, então, levá-lo ao *status* de “produto reconhecido com saudável” ou *generally recognized as safe* (GRAS) agregado ao *claim* funcional.

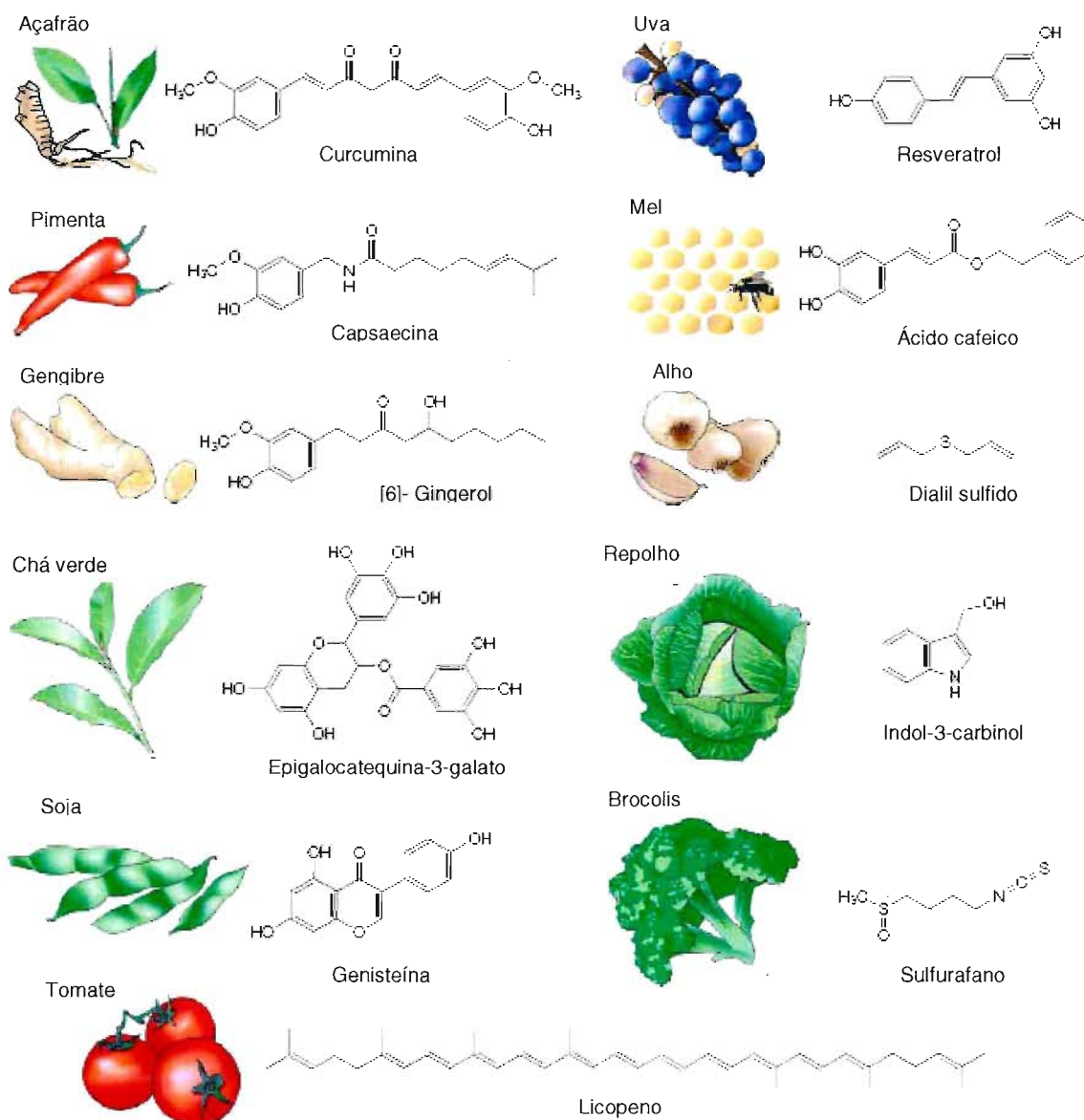


Figura 3. Estrutura molecular de alguns compostos antioxidantes extraídos de alimentos (modificado de SURH, 2003).

1.3 Classificação e mecanismo de ação de alguns antioxidantes

Sabendo-se que os compostos antioxidantes têm como principal função retardar ou inibir a oxidação lipídica em alimento, os mesmos podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação como: quelantes de metais, radical *scavenger*, *chain breaking* ou ainda, como *quencher*s de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (FRANKEL, 2005). A seguir, serão descritos esses mecanismos e os respectivos compostos antioxidantes inseridos em cada categoria.

Os compostos classificados como quelantes de metais possuem capacidade de reagir com metais de transição, como o ferro, formando complexos inativos e reduzindo a ação catalítica desses metais. Como exemplos de compostos que possuem habilidade em quelar metais podem-se citar o ácido ascórbico, o eritorbato de sódio, o EDTA, ácido cítrico e alguns compostos fenólicos (FRANKEL, 2005; CARLSEN et al., 2005). O EDTA, e os demais compostos que se classificam como quelantes, atuam como antioxidantes inibindo as reações catalisadas pelos metais por meio de diferentes mecanismos, sendo esses: prevenção do ciclo "redox" do metal, ocupação dos sítios de reação do metal e impedimento estérico das interações entre metais e substrato lipídico (MC CLEMENTS & DECKER, 2000). A adição de EDTA em emulsão contendo óleo de salmão, por exemplo, apresentou eficiência em retardar a oxidação lipídica, pois o EDTA possui alta capacidade em quelar o ferro, prevenindo assim a sua interação com os peróxidos da emulsão (MEI, MEI et al., 1998; ALAMED et al., 2006). Já o eritorbato de sódio, usualmente empregado como antioxidante em embutidos, além de atuar com quelante de metais devido ao seu potencial redutor, funciona também como catalisador no processo de cura, melhorando a fixação dos pigmentos nas carnes (SAHIDI et al., 1985; ALAMED et al., 2006).

Os compostos, que apresentam atividade radical *scavenger*, agem retardando a velocidade de auto-oxidação lipídica por um processo que converte os radicais lipídicos ou espécies reativas de oxigênio em espécies menos reativas. O ácido ascórbico (**Figura 4**), por exemplo, além de atuar como quelante de metais, possui uma estrutura capaz de doar dois elétrons reduzindo a formação de radicais lipídicos, o que o classifica também como *scavenger*. Devido a capacidade de 1 mol de ácido ascórbico reduzir 2 mols de íon férrico a ferroso, esse composto é usado

como padrão de referência no método FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*), que avalia a atividade antioxidante através da capacidade em reduzir o Fe^{+3} para Fe^{+2} ($\text{AA} + 2\text{Fe}^{+3}\text{-TPTZ} \rightarrow 2\text{Fe}^{+2}\text{-TPTZ} + \text{DHA}$; onde AA – ácido ascórbico; DHA – ácido dehidroascórbico – **Figura 4**), ou seja, quanto maior a capacidade dos compostos em doar elétrons para o radical, melhor a atividade antioxidante da substância (FRANKEL, 2005; ALAMED et al., 2009; BENZIE & STRAIN, 1996).

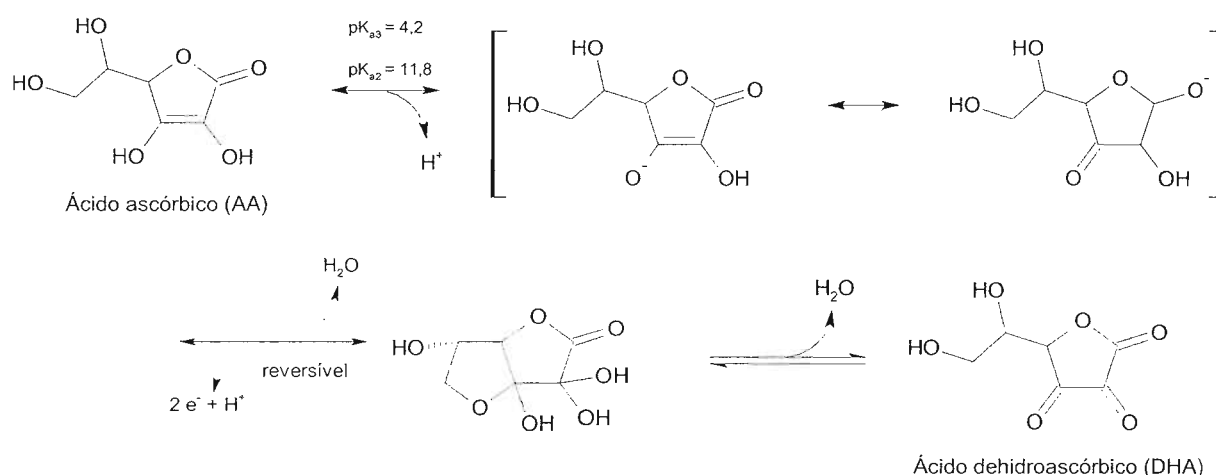
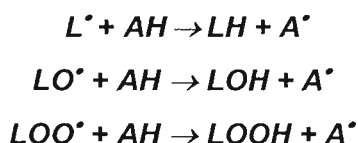


Figura 4. Natureza química do ácido ascórbico e do ácido dehidroascórbico (modificado de WIRSTA et al., 2003)

Os antioxidantes classificados como *chain breaking* atuam no radical peroxila formando radicais intermediários de baixa atividade. Esses compostos são capazes de doar átomos de hidrogênio rapidamente para o radical lipídico, resultando em um radical estável ou em outros produtos estáveis (FRANKEL, 2005; HUDSON, 1990). Como exemplos, podem ser citados os fenóis, as hidroquinonas e as aminas aromáticas, que contêm pontes O-H e N-H, relativamente fraca, favorecendo a transferência de átomos de hidrogênio para o radical (DENISOV & AFANAS'EV, 2005).



onde: LOO^{\bullet} , LO^{\bullet} e L^{\bullet} – lipídeos radicais; AH – antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e A^{\bullet} – antioxidante radical, LH – lipídeo original.

O α -tocoferol (**Figura 5**), por exemplo, possui um grupamento OH muito ativo em sua estrutura e isso lhe confere capacidade de reagir rapidamente com radicais

peroxila doando átomos de hidrogênio, formando hidroperóxidos e radicais de tocoferol. Esses radicais de tocoferol formados são, então, estabilizados por ressonância, gerando radicais menos reativos. Sequencialmente, os radicais α -tocoferila gerados, associam-se formando dímeros estáveis. Dessa forma, o α -tocoferol pode ser classificado como *chain breaking* e, por ser uma substância apolar, atua com maior eficiência em sistemas lipídicos ou em emulsões do tipo óleo em água (FRANKEL, 2005).

Outro tipo de antioxidante artificial, análogo ao α -tocoferol, é o ácido carboxílico conhecido como trolox (FRANKEL, 2005). Enquanto o α -tocoferol é um composto lipossolúvel natural, o trolox é uma substância hidrossolúvel artificial com capacidade de agir em compartimentos hidrofílicos celulares (CASTRO et al., 2006a) e na interface de emulsões (FRANKEL, 2005). Quando comparado ao α -tocoferol, o trolox possui maior número de hidroxilas na molécula (**Figura 5**) e maior capacidade de doar átomos de hidrogênio resultando em uma maior “eficiência anti-radical”, comparado ao α -tocoferol. Entretanto, essa eficiência depende das condições da análise e da sua concentração em relação ao peso da amostra (YAMAGUCHI et al., 1998; FRANKEL, 2005; LEE et al., 2005).

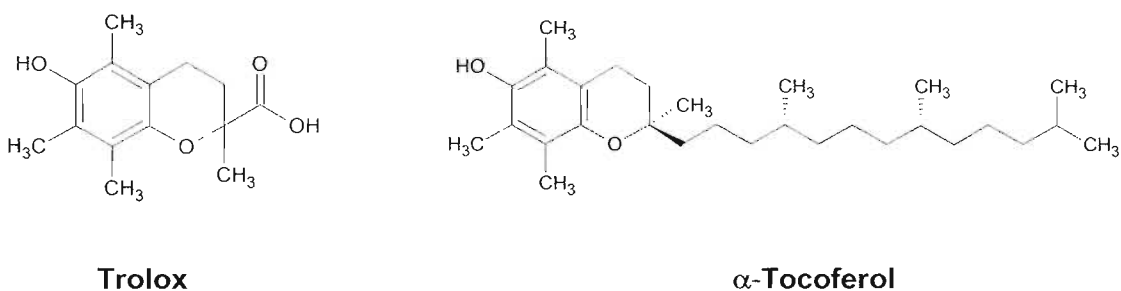


Figura 5. Estrutura molecular do α -tocoferol (modificado de HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2004)

Já os compostos capazes de atuar como *quencher*s ou sequestradores de $^1\text{O}_2$ reduzem a velocidade de iniciação da oxidação lipídica inibindo a formação do radical peróxido por meio da doação de elétrons para o $^1\text{O}_2$. Os carotenóides, tais como β -caroteno e licopeno, assim como as xantofilas (luteína e astaxantina), são classificados como *quencher*s ou antioxidantes preventivos, pois reagem com o $^1\text{O}_2$ inibindo a formação de radicais peroxila (WILLIS & WIANS Jr., 2003).

Alguns compostos podem, ainda, apresentar mais de um mecanismo de ação, ou seja, podem atuar como quelantes, *scavengers* e/ou *chain breaking*. A exemplo, podem ser citados os flavonóides, que são polifenóis de baixo peso molecular e possuem expressiva atividade antioxidante. A atuação desses compostos a partir desses três mecanismos depende da sua estrutura molecular e do meio de reação em que é avaliado (ALAMED et al., 2009; AMMAR et al., 2009). Os flavonóides são classificados em diferentes grupos, destacando-se flavonas, flavonol, flavanols e flavanol (**Figura 6**). Existem, ainda, flavonóides que não pertencem a esses quatro principais grupos e são classificados como catequinas e cianidanol (**Figura 6**).

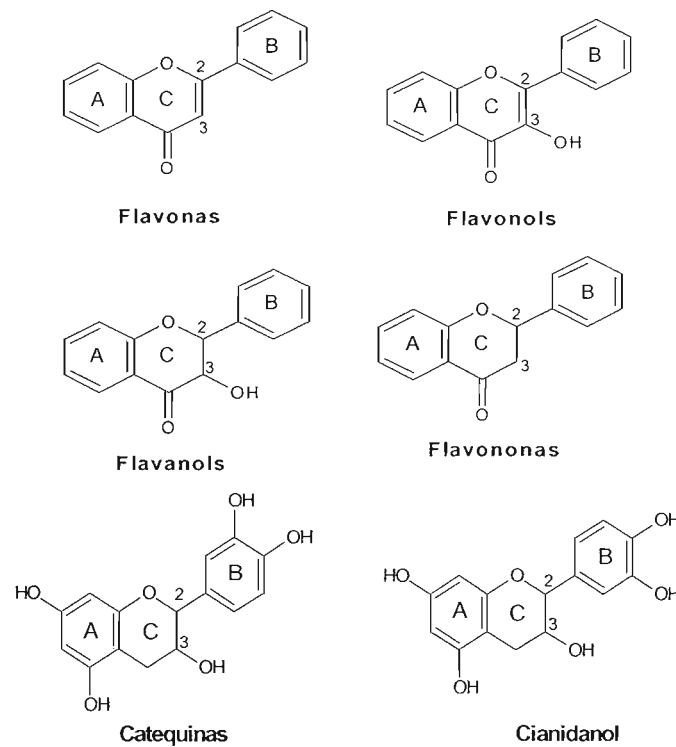
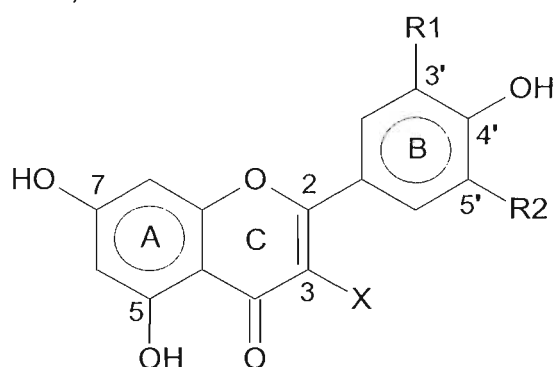


Figura 6. Principais classes dos flavonóides e flavonóides classificados como catequinas e cianidanol (modificado de DENISOV & AFANA'S EV, 2005).

Pode-se observar que a diferença básica entre os quatro principais tipos de flavonóides se dá pela presença de uma hidroxila no carbono 3 do anel C (flavonols e flavanols), além da presença da dupla ligação entre os carbonos 2,3 do anel C (flavonas e flavonols), já a ausência da dupla ligação entre o carbono 2,3 do anel C e ausência da hidroxila na posição 3 do anel C o classifica como flavonona e essas características estruturais conferem mecanismos de ação distintos a esses compostos (FRANKEL, 2005; DENISOV & AFANAS'EV, 2005).

Além das diferenças descritas acima, observa-se que a atividade antioxidante de um flavonóide depende principalmente da presença de hidroxilas no anel A (posição 5 e 7) e/ou no anel B (posição 3' e 4' ou 4' e 5'), sendo esse último classificado como grupamento catecol (**Figura 7**). Ou seja, o maior número de hidroxilas confere maior capacidade de doar átomos de hidrogênio ou elétrons atuando como *chain breaking* ou radical *scavenger* (AMMAR et al., 2009; ALAMED et al., 2009; FRANKEL, 2005; DENISOV & AFANAS'EV, 2005). A presença de hidroxilas nas posições 3',4' ou 4',5' do anel B proporciona maior estabilidade do radical devido formação de pontes de hidrogênio intramoleculares que favorecem a estabilidade do carbono conferindo uma alta atividade *chain-breaking*, resultando em uma maior capacidade de doar átomos de hidrogênio (JUSTINO et al., 2006; DENISOV & AFANA'S EV, 2005; HUDSON, 1990). Dessa forma, a hidroxilação dos anéis A e B, desses flavonóides, influencia sua atividade antioxidante, sendo que a presença do grupo OH na posição 3 do anel C também é um fator importante para essa propriedade (JUSTINO et al., 2006), conforme descrito anteriormente. A capacidade dos flavonóides em quelar metais ocorre a partir do grupo catecol (3',4'-dihidroxi) no anel B ou do grupamento cetol (3-OH-4ceto) no anel C. Alguns estudos mostram que a atividade quelante dos flavonóides é mais eficaz na inibição da indução de oxidação catalisada por metais que na indução da oxidação catalisada por radicais peroxila, dependendo do meio em que é avaliado (FRANKEL, 2005; BECKER et al., 2007).



	X	R ₁	R ₂
Quercetina	OH	OH	H
Rutina	rutinose	H	OH

Figura 7. Estrutura básica dos flavonóides e de alguns antioxidantes flavonóides (modificado de FRANKEL, 2005).

Dentre os flavonóides com ação antioxidante destaca-se a quercetina (**Figura 7**), encontrada em chá verde, maçãs, nozes, frutas vermelhas e cebola (RAMADAN, 2008). A quercetina é classificada como flavonol, apresentando uma hidroxila na posição 3 do anel C e uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C. Além disso, apresenta um grupamento catecol na posição 3', 4' do anel B, o que confere alta capacidade em quelar metais. A combinação desses três elementos estruturais confere uma alta atividade antioxidante à quercetina (FRANKEL, 2005; DENISOV & AFANA'S EV, 2005). Outro flavonóide bastante estudado é a rutina, que apresenta um grupo catecol na posição 4',5' do anel B (**Figura 7**) e possui um resíduo de açúcar (rutinose) ligado à posição 3 do anel C, o que a torna um pouco mais hidrossolúvel que a quercetina. Por esse motivo a rutina apresenta melhor atividade antioxidante quando associada à outros compostos e aplicada em sistemas emulsionados, pois o caráter polar do resíduo de açúcar confere capacidade de se localizar na fase aquosa do sistema, atuando como quelante ou *scavenger* de radicais (BECKER et al., 2007).

O resveratrol e o ácido carnósico são outros compostos fenólicos classificados como não flavonóides e que apresentam alta atividade antioxidante (**Figura 8**). O resveratrol é classificado como um stilbenóide e pode ser encontrado na uva e em bebidas derivadas de uva, enquanto o ácido carnósico é um diterpeno fenólico extraído principalmente do alecrim. O ácido carnósico apresenta uma estrutura com três anéis, incluindo um anel fenólico e um grupo carboxílico (COOH) em sua estrutura (FRANKEL, 2005), o que confere caráter hidrofílico e capacidade de atuar com radical *scavenger*.

Outro composto classificado como um ácido fenólico não flavonóide é o ácido cafeico (**Figura 8**) encontrado em uvas brancas, vinho branco, azeitona, óleo de oliva, espinafre, aspargo, café, mel e própolis (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2004). A presença de um grupo catecol (3,4-dihidroxi) na estrutura do ácido cafeico, associado à presença de um radical carboxílico (COOH), promove alta eficiência em quelar metais e maior facilidade na doação de átomos de hidrogênio (TAH) ou elétrons (TE) para o radical (GÜLÇİN, 2006). Dessa forma, o ácido cafeico pode ser classificado como composto *chain-breaking* ou *radical-scavenger* dependendo do método e do meio em que está sendo avaliado.

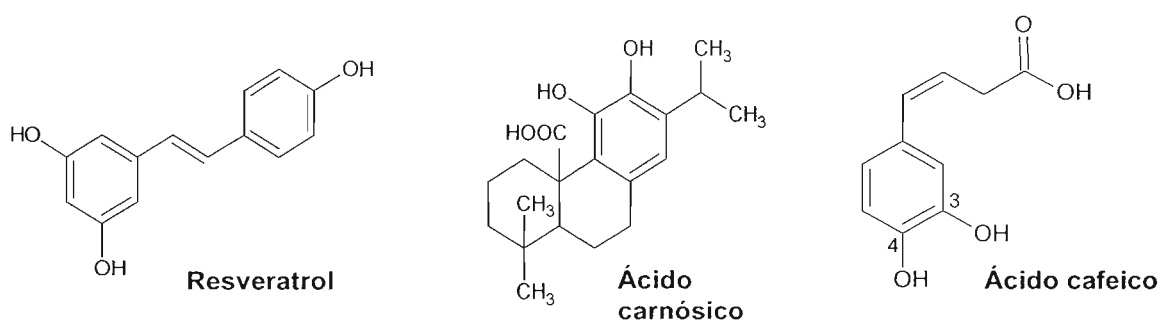


Figura 8. Estrutura dos antioxidantes resveratrol, ácido carnósico e ácido cafeico (modificado de HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2004).

Além de todas as substâncias descritas acima, outros compostos, tais como proteínas, amino ácidos, isoflavonas da soja (genisteína e daidzeína), também apresentam resultados positivos para atividade antioxidante, quando avaliados em diferentes sistemas e concentrações, conforme resultados apresentados por LARSON (1997); KAO & CHEN, (2006) e PEÑA-RAMOS & XIONG (2003).

Dessa maneira, sabendo-se que cada composto apresenta uma determinada estrutura molecular e, conseqüentemente, um mecanismo de ação diferenciado, é possível afirmar que diferentes metodologias devem ser utilizadas a fim de avaliar seu real mecanismo de ação e seu potencial antioxidante, uma vez que o princípio e o meio de reação utilizados em cada análise diferem entre si.

1.4 Métodos de avaliação da atividade antioxidante

De forma geral, os métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante de compostos isolados ou na forma de misturas, são baseados na reação de transferência de elétrons (TE) ou doação de átomos de hidrogênio (TAH) entre a substância analisada e o radical presente no meio. De acordo com Sánchez-Moreno (2002), os métodos *in vitro*, utilizados para avaliação da atividade antioxidante, podem ser classificados como métodos que analisam a peroxidação lipídica utilizando um substrato lipídico ou como métodos que mensuram a atividade *radical scavenger* (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998). Dentre os métodos baseados na habilidade em inibir um radical sem a presença de um substrato lipídico, destacam-se o DPPH (2,2'-difenil-1-picrilhidrazil), o ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) e o FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*).

A **Tabela 1** resume os principais mecanismos de ação envolvidos nos métodos DPPH, ORAC e FRAP.

Tabela 1. Principais mecanismos envolvidos na avaliação da atividade antioxidante de acordo com o método aplicado

Método	Matriz utilizada	Radical	Mecanismo ^a	Atividade	Reação
DPPH	Etanol	DPPH [*]	TE ^b	<i>Radical-scavenger</i>	DPPH [*] + AH → DPPH + A [*] + H [*] ou nada
	Tampão fosfato (pH 7.0) ou β-ciclodextrina	AAPH [*]	TAH	<i>Chain-breaking</i>	AAPH [*] + AH → AAPH-H + A [*] ou AAPH [*] + Fluoresceína (FL) → AAPH-H + FL [*] ou FL-FL ^c
FRAP	Tampão acetato (pH 3.6)	Fe ⁺³	TE	<i>Radical-scavenger</i>	TPTZ-Fe ⁺³ + AH → TPTZ-Fe ⁺² + A [*] + H [*] ou nada

^a Huang et al. (2005); Laguerre et al. (2007) –TE (transferência de elétrons); TAH (Transferência de átomos de hidrogênio)

^b A abstração de um átomo de hidrogênio do AH pelo radical DPPH^{*} é uma reação marginal (Foti et al., 2004).

^c Radical fenoxil estável que rapidamente forma outros derivados sem emissão de fluorescência (Ou et al., 2001)

Um dos radicais mais usados para análises que mensuram a atividade ou habilidade em inibir um radical é o método conhecido por DPPH. Nesse caso, os antioxidantes devem apresentar capacidade em doar elétrons ou átomos de hidrogênio para o radical estável DPPH^{*} (2,2'-difenil-1-picrilhidrazil) alterando assim a cor do composto que passa de roxo a amarelo ($AH + DPPH^* \rightarrow A^* + DPPHH$). O radical estável apresenta um máximo de absorção a 515-520 nm. Após o equilíbrio da reação, observa-se qual foi a quantidade de antioxidante consumida para reduzir 50% do DPPH^{*} (IC₅₀). Quanto menor o valor de IC₅₀, maior o seu poder antioxidante (SANCHÉZ-MORENO et al., 1998; BRAND-WILLIAMS, 1995). Embora o método DPPH^{*} seja comumente utilizado, por espectrometria, não deve ser aplicado para avaliar compostos que apresentem coloração ou pigmentos, pois ocorre interferência nos valores de absorbância (FRANKEL, 2005).

Para o método FRAP o princípio de TE é o sistema atuante. Os antioxidantes avaliados por esse método devem ser capazes de transferir elétrons para o oxidante Fe⁺³. Isso promove uma mudança na absorbância, devido ao aparecimento de uma cor azul intensa, que é medida por espectrometria a 593 nm. Os valores de absorbância são utilizados para quantificar a força redutora do antioxidante ($Fe^{3+} + AH \rightarrow A^* + Fe^{2+} + H^+$) (BENZIE & STRAIN, 1996; BENZIE & STRAIN, 1999).

Já o método ORAC baseia-se na TAH utilizando elementos fluorescentes e um radical iniciador ou azo-indutor. No método ORAC, os radicais do azo-indutor AAPH (2,2 azobis (2-amidinopropano) dihidroclorido) são gerados a 37°C (AAPH[•]). Inicialmente, esses radicais reagem com um composto fluorescente como a fluoresceína (FL) (CAO et al., 1995). A presença de um antioxidante no meio permite que os antioxidantes com atividade *chain-breaking* doem átomos de hidrogênio ao AAPH[•] (AAPH[•] + AH → A[•] + AAPH-H), inibindo ou retardando a reação desse radical com a fluoresceína (OU et al., 2002). Nesse caso, ocorre perda da fluorescência, indicando efeito protetor do antioxidante. Essa atividade é mensurada a partir da área relativa da curva de queda da intensidade da fluorescência, comparando-se ao branco, isento do antioxidante (OU et al., 2001; DÁVALOS et al., 2004; NAGUIB, 2000).

Além dessas metodologias, outros métodos, que utilizam substratos lipídicos ou matrizes alimentícias, podem ser empregados para avaliar a atividade antioxidante de compostos. Em geral, esses métodos avaliam a capacidade de doar átomos de hidrogênio do composto para o radical lipídico formado ou para o azo-iniciador presente no meio. Embora matrizes compostas de triacilgliceróis (TG) e fosfolipídeos sejam consideradas excelentes substratos oxidáveis, assim como os mais representativos em termos de lipídeos dietéticos, a validação desses métodos é questionada devido à complexidade da ação antioxidante nesse tipo de sistema (micelas ou emulsões) (LAGUERRE et al., 2007).

A determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ou TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*), pode ser citada como exemplo desses métodos, e tem como princípio avaliar a formação de produtos secundários da oxidação lipídica em matrizes contendo substratos oxidáveis. A interação de radicais lipídicos (L[•]) com O₂ leva a formação de hidroperóxidos que se decompõem em aldeídos voláteis, tais como malondialdeído (MDA). A reação de 1 mol de MDA com 2 mols de TBA leva a formação de um composto de cor rosa que pode ser analisado através de técnicas cromatográficas ou espectrofotométricas a 530 nm. Essa metodologia utiliza um meio contendo substrato lipídico oxidável ou uma matriz alimentícia com teor de gordura conhecido. Nesse caso, o antioxidante reage com o radical lipídico formando um radical estável. Portanto, quanto maior a atividade

antioxidante do composto menor será a formação de TBARS (FENAILLE, 2001; LYKKESFELDT, 2007) e conseqüentemente, menor o valor de absorbância.

A **Tabela 2** apresenta os principais mecanismos do método conhecidos como TBARS e LAOX (*Linoleic acid peroxidation*). Deve-se ressaltar que o método LAOX utiliza emulsão de ácido linoléico como substrato oxidável, enquanto o TBARS avalia a formação de produtos secundários da oxidação, a partir de uma matriz alimentícia.

Tabela 2. Principais mecanismos envolvidos na avaliação da atividade antioxidante de acordo com o método aplicado

Método	Matriz utilizada	Radical	Mecanismo ^a	Atividade	Reação
LAOX	Tampão fosfato (pH 3.6)	AAPH*	TAH	<i>Chain-breaking</i>	$AAPH^* + AH \rightarrow AAPH-H + A^*$ ou $AAPH^* + LH \rightarrow AAPH-H + L^*$ $L^* + O_2 + LH \rightarrow LOOH + L^* \rightarrow$ TBARS
TBARS	Homogenato de carne de frango (70°C)	Peróxidos lipídicos	TAH	<i>Chain-breaking</i>	$L^* + AH \rightarrow LH + A^*$ ou $L^* + O_2 + LH \rightarrow LOOH + L^* \rightarrow$ TBARS

^aHuang et al. (2005); Laguerre et al. (2007) – TAH (*Transferência de átomos de hidrogênio*).

Assim, observando-se as diferentes metodologias existentes, pode-se dizer que a atividade antioxidante dos compostos depende do método empregado conforme relatado por Wu et al. (2004), e que os valores de atividade antioxidante só deveriam ser comparados quando a metodologia e o solvente das soluções fossem o mesmo (Pérez-Jiménez et al., 2008). Porém, para avaliar se o composto analisado é realmente eficiente em um sistema alimentício, é importante utilizar técnicas que simulem ou utilizem substratos oxidáveis, tais como LAOX e TBARS. Alamed et al. (2009), por exemplo, utilizou o método ORAC e DPPH para avaliar a capacidade radical *scavenger* de compostos polares e apolares e em seguida, analisou a eficiência desses compostos em carne e em emulsão óleo em água. A maior atividade de alguns compostos, determinada pelos métodos ORAC e DPPH, não foi observada em matrizes contendo substrato lipídico.

1.5 Avaliação do grau de oxidação lipídica

Em sistemas emulsionados ou em matrizes alimentícias, que se apresentam na forma de emulsão óleo em água - O/A (salsichas, maionese, molhos de saladas e leite) ou água em óleo - A/O (margarinas e manteigas), a oxidação lipídica é um fenômeno interfacial afetado por constituintes antioxidantes e pró-oxidantes (metais, proteínas, enzimas, etc.). Esses, por sua vez, são influenciados pela interação entre lipídeo e componentes aquosos e pela composição da interface entre eles (FRANKEL, 2005). Dessa forma, dependendo da natureza do antioxidante (hidrossolúvel ou lipossolúvel), sua eficiência será maior ou menor em função da sua localização nessa matriz. Em emulsões do tipo O/A, os antioxidantes lipofílicos se localizam na interface óleo-água, apresentando maior eficiência em inibir a oxidação do que os hidrofílicos, que se dispersam na fase aquosa (*paradoxo polar*). Por outro lado, em micelas preparadas com ácido linoléico, os antioxidantes polares, como o trolox, são mais ativos do que em emulsões, pois permanecem na fase aquosa, reduzindo metais e atuando como radical *scavenger* (FRANKEL, 2005; ALAMED et al., 2009).

Portanto, para monitorar a eficiência de um composto em uma matriz alimentícia, outros métodos podem ser empregados para determinação da extensão da oxidação lipídica em alimentos. Como exemplos, têm-se a determinação do valor de peróxido (VP), método de dienos conjugados (DC), determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), determinação de compostos voláteis por cromatografia gasosa (CG), utilização de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação de produtos secundários da oxidação como MDA, análise sensorial, entre outros. A **Tabela 3** apresenta um resumo das características básicas de algumas dessas metodologias.

Tabela 3. Métodos de determinação da extensão oxidativa em amostras de alimentos

Métodos	Exemplos	Características
Análise de produtos primários da oxidação (LOOH) ^{b,c}	Determinação de Índice de Peróxido (IP) ou Valor de Peróxido (VP) Dienos conjugados	Diferença entre a formação e a decomposição dos peróxidos. Resultados expressos em miliequivalentes de O ₂ ou peróxido por Kg de matéria graxa ou de amostra. Deslocamento das duplas ligações determinado por espectrofotometria. O maior número de duplas ligações conjugadas é indicado quanto maior for a absorbância a 232nm.
Análise dos produtos secundários da oxidação ^{a,b,c,d}	Teste do ácido 2-tiobarbitúrico – TBA*	Reação do malondialdeído (MDA) com o TBA formando um complexo de cor rosa (532-535nm). Determinação das "substâncias que reagem com o TBA, ou "TBARS".
Cromatografia ^e	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	Avalia o teor de peróxidos, hidroperóxidos e outros produtos secundários da oxidação. A análise é feita com fase reversa e com uso de detectores diodo (DAD), fluorescência, UV-Vis (ultravioleta) ou amperométricos. Seus resultados apresentam correlação com os resultados de análise sensorial.
	Cromatografia Bidimensional	Na cromatografia gasosa bidimensional (GC-GC) ou na cromatografia líquida bidimensional (LC-LC), pequenas frações do efluente da primeira coluna são transferidas para uma segunda coluna, no qual a seletividade diferenciada desta segunda coluna fornece um aumento da resolução dos picos cromatográficos.
	Espectrometria de Massas associada a um detector de HPLC	A espectrometria de massas associada ao detector de HPLC de fase reversa ou normal permite a melhor caracterização de hidroperóxidos termolábeis e produtos secundários da oxidação lipídica não voláteis e de alto peso molecular.
Determinação de compostos voláteis ^{d,e}	Cromatografia gasosa para análise de compostos voláteis (aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos)	"Método de <i>headspace</i> dinâmico" Dosagem de produtos secundários da oxidação separadamente por CG (Cromatografia Gasosa).
Outros métodos ^{a,d}	Análise sensorial	Análise descritiva qualitativa (ADQ) com provadores treinados. Identificação e quantificação de sabores e odores específicos da oxidação. Testes de diferença e de aceitabilidade.
	OSI (<i>Oxidative Stability Instrument</i>) e Rancimat	Após iniciação forçada da oxidação utilizando temperatura de 110-130°C e corrente de ar ou de oxigênio, avalia-se o teor de ácidos voláteis por condutimetria.

^aCASTRO et al. (2005); ^bSEBRANEK et al. (2005); ^cTONG et al. (2000); ^dHANNAH et al. (2003); ^eFRANKEL (2005)

A associação de metodologias para determinar a formação de peróxidos (VP) e o teor de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), expressos como MDA, tem sido utilizada em diversos estudos que avaliam a eficiência de compostos antioxidantes na redução ou inibição da oxidação lipídica em alimentos

durante o *shelf life* (VALENCIA et al., 2008; GEORGENTELIS et al., 2007; AGUIRREZÁBAL et al., 2000; ESTEVÉZ & CAVA, 2006; PAPADIMA & BLOUKAS, 1999; ISMAIL et al., 2008; ZANARDI et al., 2004; AMMAR et al., 2009). Esses métodos, em geral, são associados a outras metodologias tais como: análise sensorial; análise de cor; parâmetros de textura e análise microbiológica, as quais permitem visualizar outras alterações no alimento além de auxiliar na compreensão dos resultados obtidos. O melhor resultado em amostras de alimentos, como salsichas, é observado quando o valor de peróxido se encontra abaixo de 2.0 mEq peróxido/Kg de lipídeo e o valor de TBARS, expresso como mg MDA/Kg de amostra, fica abaixo de 0.5 a 1.0 mg MDA/Kg amostra, indicando maior eficiência dos antioxidantes avaliados (ESTEVÉZ & CAVAS, 2006; VALENCIA et al., 2007).

A eficiência de qualquer substância que apresente atividade antioxidante pode ser melhorada quando, em um mesmo sistema, existem vários compostos que atuem por meio de diferentes mecanismos para alcançar o mesmo fim. Dessa forma, sinergismo pode ser definido como um fenômeno no qual uma mistura de dois ou mais compostos, quando adicionados em um mesmo sistema, resulta em um efeito mais pronunciado que aquele apresentado pelos compostos isoladamente (LAGUERRE et al., 2007). Portanto, ao avaliar a atividade antioxidante de qualquer substância em uma matriz é interessante utilizar compostos com diferentes características de solubilidade, diferentes proporções de concentrações, bem como tipos de solventes e extratos diversificados, pois essas variações permitem estudar todas as variáveis que podem interferir de maneira positiva no sinergismo.

1.6 Uso de planejamentos fatoriais e análise multivariada na avaliação da atividade antioxidante de diferentes compostos naturais

Após observar os princípios, as vantagens e as limitações existentes nos diferentes métodos capazes de mensurar a atividade antioxidante, é possível afirmar que a comparação dos resultados entre métodos é inviável, uma vez que os compostos apresentarão comportamentos e valores específicos dependentes do tipo de análise empregada. Dessa forma, Laguerre et al. (2007), sugeriram que uma das formas de solucionar as divergências entre os resultados obtidos com diferentes métodos e compostos, seria através da aplicação da análise multivariada. Segundo

os autores, essa técnica estatística permite interpretar os resultados obtidos em diferentes métodos de forma simultânea e conjunta.

Portanto, a interpretação dos resultados de diferentes compostos potenciais e, diferentes metodologias pode ser feita com a aplicação de técnicas estatísticas multivariadas como a análise em componentes principais (PCA) e análise de *clusters*. Essa técnica permite resolver, de forma elegante, a diversidade dos mecanismos de ação e de outras variáveis envolvidas na análise. Nesse caso, as variáveis poderão ser reduzidas sem perda significativa de informação e a associação entre compostos e métodos poderá ser graficamente visualizada, facilitando a interpretação de processos bioquímicos envolvidos na diferenciação dos compostos avaliados.

Outro fator essencial, para a classificação da atividade antioxidante em matrizes alimentícias, é o conhecimento dos mecanismos que podem atuar durante a combinação de diferentes compostos nesse sistema. A aplicação de duas ou mais substâncias em um alimento pode levar a sinergia entre eles, e conseqüentemente à uma melhor atividade. A escolha da proporção ideal entre os compostos avaliados e a compreensão dos resultados pode ser mal interpretada devido a limitações de planejamento apresentada pelos métodos empíricos tradicionais, que consideram apenas o efeito individual de cada variável na resposta ou interações observadas em intervalos fixos de proporção.

Portanto, a técnica estatística de modelagem por superfície de resposta (MSR), introduzida por Box na década de 50 (BOX & WILSON, 1951) contribuiu para superar essas limitações, permitindo que efeitos lineares, quadráticos e interações envolvendo muitas variáveis possam ser avaliados utilizando-se um número mínimo de ensaios experimentais (CURT et al., 2004). Mais recentemente, essa técnica foi adaptada a misturas nas quais a soma dos ingredientes na formulação é sempre um valor constante. Isto é, as variáveis são dependentes e a proporção entre elas é que irá influenciar a variação final dos resultados. Tais técnicas têm sido aplicadas com sucesso tanto na otimização de parâmetros de processo, como em misturas de ingredientes em alimentos, sendo que a otimização, no desenvolvimento de alimentos, implica em definir condições de processamento, matérias-primas e formulações que maximizem resultados instrumentais ou sensoriais (CURT et al., 2004).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Utilizar técnicas estatísticas de análise multivariada para classificar diferentes compostos naturais e artificiais de acordo com a atividade antioxidante determinada por cinco métodos *in vitro*, elaborar misturas baseadas nessa classificação e aplicar essas misturas em uma emulsão cárnea a fim de compará-las com um antioxidante artificial.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a atividade antioxidante de vinte e dois compostos, escolhidos aleatoriamente dentro dos principais grupamentos químicos (fenólicos, ácidos, aminoácidos, tiols, carotenóides, entre outros), a partir de cinco metodologias *in vitro*;
- ✓ Aplicar a técnica estatística multivariada de Análise em Componentes Principais (PCA) para classificar a atividade antioxidante dos vinte e dois compostos, avaliados a partir de cinco procedimentos metodológicos;
- ✓ Selecionar os compostos naturais classificados em diferentes grupos e aplicar a técnica estatística de Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) para identificar a proporção que apresentaria sinergismo para atividade antioxidante das misturas;
- ✓ Aplicar as misturas de antioxidantes otimizadas *in vitro* em uma emulsão cárnea (salsicha) e avaliar a eficiência dessas misturas em prevenir a oxidação, comparando-as a um antioxidante artificial.

UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE ANÁLISE MULTIVARIADA PARA CLASSIFICAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS DE ACORDO COM A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Resumo

A atividade antioxidante de 22 compostos naturais e sintéticos foi avaliada a partir de cinco metodologias in vitro: 2,2-diphenyl-2-picryl-hydrazil - DPPH•; peroxidação do ácido linoléico induzida pelo azo-iniciador 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) – LAOX; determinação de TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) em homogenato preparado a base de carne de frango; avaliação do potencial antioxidante in vitro pelo método ORAC (Oxygen radical absorbance capacity assay) e capacidade redutora do Fe^{+3} - FRAP (*Ferric Reducing Ability*). Todos os resultados foram expressos em Trolox equivalente. A aplicação de técnicas estatísticas de análise multivariada sugeriu que os compostos fenólicos (ácido cafeico, ácido carnósico, genisteína e resveratrol) obtiveram maiores valores de atividade antioxidante nos métodos DPPH, FRAP e TBARS, além de apresentar alta capacidade em reagir com os radicais presentes no método ORAC, comparados a outros compostos analisados neste estudo (ácido ascórbico, eritorbato, tocoferol, BHT, trolox, triptofano, ácido cítrico, EDTA, glutathione, lecitina, metionina e tirosina). Essa eficiência apresentou correlação significativa com o número de anéis fenólicos e estrutura catecólica presentes na molécula. Baseando-se na análise multivariada será possível selecionar compostos de diferentes grupos ou Clusters e explorar melhor sua atividade antioxidante para futura aplicação em produtos alimentícios.

Palavras-chave: AAPH, antioxidante, DPPH, FRAP, ácido linoléico, ORAC, PCA e TBARS

1 INTRODUÇÃO

Produtos cárneos com alto teor de lipídeos insaturados, como carnes de suínos, aves e algumas emulsões, incluindo salsichas, são particularmente suscetíveis à rancidez oxidativa (SEBRANEK et al., 2005). Assim, os antioxidantes são largamente utilizados para controlar as alterações decorrentes da oxidação e aumentar o *shelf life* de produtos cárneos e emulsões alimentícias. Em geral, os antioxidantes podem proteger as moléculas de lipídeos da oxidação atuando como *radical scavenger*, quelantes de metais, decompondo peróxidos lipídicos em produtos estáveis ou inibindo efeitos deletérios de enzimas pró-oxidantes (LAGUERRE et al., 2007; CHAILLOU et al., 2006; PULIDO et al., 2000; FRANKEL, 2005; HALLIWELL & GUTERDIDGE, 2004; HUANG et al., 2005).

Antioxidantes sintéticos como TBHQ, BHT, BHA e eritorbato de sódio são comumente utilizados para conservação de alimentos cárneos (SEBRANEK et al., 2005; LAGUERRE et al., 2007; CHAILLOU et al., 2006; PULIDO et al., 2000; FRANKEL, 2005; HALLIWELL & GUTERDIDGE, 2004; HUANG et al., 2005; PEÑA-RAMOS & XIONG, 2003). No entanto, o uso de substâncias sintéticas em alimentos tem mostrado efeitos adversos à saúde em estudos realizados com ratos, e os consumidores têm rejeitado alimentos que contêm uma lista extensa de aditivos artificiais em sua composição (SUH et al., 2005; WILLIAMS et al., 1999; SUN & FUKUHARA, 1997). Por esta razão, vários estudos têm buscado substituir antioxidantes artificiais por antioxidantes obtidos de fontes naturais ou, ainda, reduzir o teor de antioxidantes sintéticos utilizando misturas que apresentem efeito sinérgico entre os compostos (LAGUERRE et al., 2007; PEÑA-RAMOS et al., 2003; OSBORN-BARNES et al., 2003). Além disso, alguns antioxidantes naturais possuem alta aceitação pelos consumidores devido aos benefícios que podem trazer à saúde (OSBRON-BARNES et al., 2003).

Dentre os compostos que apresentam atividade antioxidante e que atuam como *radical scavengers*, *chain-breaking* ou quelantes de metais de transição, destacam-se os fenólicos (incluindo ácidos fenólicos, diterpenos fenólicos, isoflavonas, flavonóis, flavonóides e stilbenóides), ácidos orgânicos, fosfolipídeos, tiols, amino ácidos, tocóis derivativos e pigmentos como carotenóides e xantofilas. De acordo com a estrutura molecular, a atividade antioxidante de compostos

naturais ou sintéticos pode exibir diferentes mecanismos de ação antioxidante. A combinação desses mecanismos pode levar ao sinergismo, antagonismo ou efeito antioxidante aditivo (IACOPINI et al., 2008; HEO et al., 2007). Além disso, alguns produtos derivados da oxidação podem também apresentar elevada atividade antioxidante (TURAN et al., 2007).

Diversas metodologias *in vitro* são usadas para medir a atividade antioxidante de compostos sintéticos e naturais antes da sua aplicação em matrizes alimentícias. Alguns dos métodos mais utilizados para avaliar a eficiência antioxidante dos compostos tem sido: DPPH* (*1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil*), ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity assay*) e FRAP (*Ferric Reducing Ability*) (PÉREZ-JIMENEZ et al., 2008; SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998; WU et al., 2004; BRAND-WILLIAMNS et al., 1995; BENZIE & STRAIN, 1996; NENADIS et al., 2007). Essas metodologias medem a capacidade dos compostos em reduzir um radical livre artificial e estável ou um metal de transição, a partir da transferência de elétrons ou de átomos de hidrogênio (LAGUERRE et al., 2007; NENADIS et al., 2007; FOTI et al., 2004; OU et al., 2002). Outros métodos envolvem o uso de um substrato oxidável, que pode ser um lipídeo, uma emulsão ou uma amostra biológica. Como exemplo, pode-se citar um sistema contendo uma dispersão aquosa de ácido linoléico e um azo-iniciador ou um homogenato de carne submetido a tratamento térmico. Neste caso, os produtos da decomposição dos peróxidos, como malondialdeído (MDA) podem ser mensurados a partir da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (PULIDO et al., 2000).

As técnicas estatísticas multivariadas são procedimentos descritivos utilizados para classificar amostras, e podem ser utilizados em diferentes áreas da ciência, tais como medicina, biologia, economia e educação. A aplicação desse procedimento tem aumentado muito na área da ciência dos alimentos. Uma dessas técnicas, conhecida como “Análise em Componentes Principais” (PCA) a qual permite que um determinado número de casos sejam classificados, baseando-se em um grande número de variáveis utilizando a correlação linear para reduzir o número original de variáveis (JOHNSON & WICHERN, 1992). Em outras palavras, as variáveis originais, que correspondem aos resultados de diferentes análises, são linearmente combinadas para gerar um número reduzido de novas variáveis não

correlacionadas. De acordo com LAGUERRE et al. (2007), estas novas variáveis podem ser excelentes “marcadores da atividade antioxidante”. No entanto, se um grande número de variáveis for selecionado a qualidade e a interpretação da PCA pode ser dificultada. Resumidamente, as variáveis iniciais, que correspondem aos métodos, são combinadas linearmente para gerar um menor número de novas variáveis correlacionadas denominados componentes principais. Além da PCA, a análise de Cluster é outra técnica estatística multivariada capaz de agrupar as amostras de acordo com as suas similaridades e diferenças a partir de vários critérios. Na análise de Cluster, os grupos podem ser formados visando maximizar as diferenças entre as amostras que pertencem a diferentes grupos ou minimizar as diferenças entre as amostras que pertencem ao mesmo grupo.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante de 22 compostos naturais e sintéticos, de acordo com os resultados obtidos a partir de diferentes metodologias *in vitro*, e, em seguida, aplicar a análise multivariada para agrupar esses compostos e visualizar possíveis relações entre a estrutura molecular e a atividade antioxidante.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Antioxidantes

Foram avaliados os seguintes compostos da marca Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO): α -tocoferol (T3251); resveratrol (R5010); quercetina (Q0125); L-glutationa (G4251); genisteína (G6776); β -caroteno (C9750); ácido ascórbico (A5960); DL-metionina (M9500); ácido carnósico (C0690); luteína (X6250); licopeno (L9879); ácido cafeico (C0625); rutina (R5143); ácido cítrico (C0759); trolox (Fluka 93509); L-tirosina (T3754); lecitina de soja (P7443); butil-hidroxitolueno - BHT (B1378); DL-triptofano (T3300) e astaxantina (A9335). O EDTA sal dissódico (ácido etilenodiaminotetracético) foi obtido do laboratório Labsynth Ltda (Diadema, SP) e o Eritorbato de sódio foi gentilmente cedido pela empresa Kienast & Kratschmer Ltda (KRAKI, Santo André, SP).

2.2 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes para análise adquiridos da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO): Azo-iniciador AAPH ou 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride 97% (44,091-4), ácido linoléico 99% (L1376), DPPH ou 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (D9132), TBA ou 2-ácido tiobarbitúrico 98% (T5500), BHT ou 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol 99% (1378), TCA ou ácido tricloroacético 99% (T4885), TEP ou 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (T9889), TPTZ ou 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (T1253) e água grau HPLC (270733). Polioxietileno sorbitan monolaurate (Tween 20), acetato de sódio trihidratado e sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram obtidos da Labsynth Ltda (Diadema, SP). Cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) da marca Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, RJ), Dimetilformamida (DMF) da Mallinckrodt J.T.Baker (Griesheim, Germany) e a Trapsol - β -cyclodextrin randomicamente metilada obtida empresa Cyclodextrin Technologies Development Incorporation (High Springs, FL). Os demais reagentes utilizados apresentaram grau de pureza analiticamente compatível.

2.3 Preparo das soluções

Os antioxidantes hidrossolúveis (resveratrol, glutathione, ácido ascórbico, metionina, ácido carnósico, ácido cafeico, ácido cítrico, trolox, eritorbato de sódio, triptofano e EDTA) foram dissolvidos em água, enquanto os padrões lipossolúveis (α -tocoferol, genisteína, β -caroteno, lecitina de soja, luteína, licopeno, BHT e astaxantina) foram dissolvidos em etanol. Rutina e quercetina foram dissolvidas em água e DMF na proporção 1:1 (v/v). Todas as soluções foram preparadas numa concentração de 1 mmol/L. As soluções foram transferidas para um frasco de cor âmbar, lacrados com nitrogênio, fechados com parafilme e armazenados em freezer (-25°C). Todos os solventes utilizados foram grau HPLC.

2.4 Determinação da atividade antioxidante dos compostos pelo método DPPH* (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil)

Essa metodologia, inicialmente proposta por BRAND-WILLIAMS et al. (1995), foi conduzida de acordo com as modificações propostas por Sánchez-Moreno et al. (1998). Primeiramente, adicionou-se uma alíquota de 0.1 mL de cada solução de antioxidante na concentração de 1.0 mmol/L à 3.9 mL de solução etanólica de DPPH* (64 µM) preparada no dia. A absorbância a 515 nm foi medida a cada 10 segundos, utilizando-se um espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), até o momento em que a reação alcançasse o *steady state*. As soluções que apresentavam cor ou pigmento não foram avaliadas neste método por apresentarem interferência na leitura. O percentual de DPPH remanescente [DPPHr*] foi calculado da seguinte forma: $\%[\text{DPPHr}^*] = (\text{Abs}_{\text{SS}}/\text{Abs}_{\text{T0}}) \times 100$, na qual Abs_{SS} representa o valor de absorbância medida no *steady state*; e Abs_{T0} , o valor da leitura no início da leitura. Primeiramente, foi plotado um gráfico da $\%[\text{DPPHr}^*]$ vs. tempo e a partir desse gráfico obteve-se uma regressão não linear dos dados. A primeira derivada foi igualada a zero e usada para identificar a $\%[\text{DPPHr}^*]_{\text{SS}}$ no *steady state*. O percentual da atividade antioxidante (%AA) das amostras foi calculado como: $\%AA = 100 - \%[\text{DPPHr}^*]_{\text{SS}}$.

Todas as amostras foram avaliadas na concentração de 1.0 mmol/L e os resultados expressos como Trolox equivalente (TE mmol/L), baseado na curva de calibração preparada nas mesmas condições: $TE \text{ (mmol/L)} = 0.02 - 0.0004 * (100 - \%[\text{DPPHr}^*]_{\text{SS}}) + 0.0003 * (100 - \%[\text{DPPHr}^*]_{\text{SS}})^2$; ($r = 0.96$, $p < 0.01$).

2.5 Peroxidação do ácido linoléico induzida pelo azo-iniciador 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) – LAOX

Inicialmente proposto por Axelrod et al. (1981), o método foi conduzido de acordo com Castro et al. (2006b). Primeiramente, preparou-se uma micela com 156 µL de ácido linoléico 99% e 180 µL de Tween-20, agitando-se em vortex. Com uma pipeta *pasteur* adicionou-se gotas NaOH 2N até que a micela ficasse translúcida. O volume foi completado para 50 mL com água destilada, previamente fervida e resfriada, e a micela foi dividida e transferida para frascos de vidro âmbar (10 mL), lacrados com nitrogênio e armazenados em freezer (-25°C) até o momento de uso.

Um total de 100 μL de solução contendo a amostra (1 mmol/L) foi adicionada a 1.9 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7.4), 500 μL de solução AAPH (7.4 mmol/L) e 500 μL da micela preparada com ácido linoléico em tubos de ensaio com tampa. Os tubos tampados foram agitados em vortex por 15 segundos, e levados ao banho-maria (Quimis Q226-M1) a 37°C por 1 hora agitando-se na velocidade 4 por 1 minuto a cada 10 minutos. A seguir, uma alíquota de 1.0 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico - TBA/ácido tricloroacético - TCA/butilato hidroxil tolueno - BHT (TTB) foi adicionada, e os tubos foram incubados a 100°C por 15 min. A solução TTB foi preparada dissolvendo-se 3.75 g de ácido tiobarbitúrico (TBA), 93.75 mg de ácido tricloroacético (TCA) e 5.0 mg butilato hidroxil tolueno (BHT) em HCl 0.25N até o volume final de 25 mL. Após resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 1,100 g por 15 min a 25°C. Os produtos da oxidação representados pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinados por espectrofotometria a 533 nm utilizando-se espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Para preparo do branco, adicionou-se água e a esta absorbância atribuiu-se 100% de oxidação. O percentual da atividade antioxidante foi calculado da seguinte forma: $\%AA = [Abs_{\text{branco}} - Abs_{\text{amostra}} / Abs_{\text{branco}}] \times 100$. Todas as amostras foram avaliadas na concentração 1.0 mmol/L, e os resultados expressos em Trolox equivalente (TE mmol/L), baseando-se na curva de calibração preparada nas mesmas condições: $TE \text{ (mmol/L)} = 0.01 * \exp 0.06 * (\%AA)$, ($r = 0.79$, $p < 0.01$).

2.6 Determinação de TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*) em homogenato preparado a base de carne de frango

Para avaliar a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em carne de frango, utilizou-se a metodologia descrita por Miller (1998). Inicialmente, foram obtidas amostras de coxa e sobrecoxa de frango desossadas sem adição de antioxidantes, gentilmente cedidas pela empresa Kienast & Kratschmer Ltda. (KRAKI, Santo André, SP). As amostras foram homogeneizadas em Turratec TE-102 (Tecnal®, Piracicaba, SP), na velocidade de 18.000 rpm por aproximadamente 30 segundos. Uma alíquota do homogenato (5 g \pm 0.5) foi pesada em cápsula de porcelana, e, em seguida, adicionou-se 0.5 mg de antioxidante (0.01% em relação ao peso da amostra) calculando-se o volume equivalente da solução 1 mmol/L. O homogenato foi aquecido em um forno elétrico Ruby VIP

(Layr®, São Paulo, SP) a 100°C e o aquecimento foi feito até atingir 70°C no centro geométrico da amostra. Essas amostras foram estocadas a 4°C, no escuro, durante 48 horas. Em seguida, adicionou-se 45.5 mL de uma solução 10% TCA em H₃PO₄ e 1 mL de BHT 0.2 mg/mL. O volume da solução de TCA variou de acordo com o volume da solução de antioxidante adicionado anteriormente. A precipitação de proteína com TCA foi feita em homogeneizador Turratec TE-102 a 18,000 rpm durante 30 segundos. Esse homogenato foi filtrado em papel Whatman no 3, e uma alíquota (5 mL) do filtrado foi transferida para dois tubos (A e B). No tubo A, adicionou-se 5 mL de TBA 0.02 M, e no tubo B, 5 mL de água destilada. O conteúdo dos tubos foi armazenado durante 20 horas protegidos da luz. Após esse período, a absorbância foi medida a 530 nm ($\lambda = 530$ nm) em espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Os resultados foram calculados inicialmente em nmol equivalentes de MDA/g homogenato/ml solução, utilizando-se uma curva padrão feita com o reagente TEP (MDA/g homogenato = 0.009 + 0.08 λ_{530} nm) ($r = 0.99$, $p < 0.01$). Finalmente os resultados foram expressos em Trolox equivalente (TE mmol/mL), baseando-se em uma curva preparada nas mesmas condições: TE (mmol/mL) = 2.96 - 0.29 * [nmol MDA/g homogenato/ml] + 0.01 * [nmol MDA/g homogenato/ml]^2 - 0.0001 * [nmol MDA/g homogenato/ml]^3, ($r = 0.82$, $p < 0.01$).

2.7 Avaliação do potencial antioxidante in vitro pelo método ORAC (Oxygen radical absorbance capacity assay)

O método automático ORAC utilizado foi realizado de acordo com Ou et al. (2001) com algumas modificações propostas por Huang et al. (2005). Nessa análise, um azo indutor (AAPH) a 37°C abstrai um hidrogênio da fluoresceína, reduzindo a fluorescência medida a 485 nm de excitação e a 525 nm de emissão (HUANG et al., 2005). Na presença de antioxidante, o AAPH não é capaz de reagir com a fluoresceína e a fluorescência é inibida proporcionalmente à ação do antioxidante.

Primeiramente, as soluções hidrossolúveis (1 mmol/L) foram diluídas utilizando-se tubos de ensaio, em 75 mmol/L de tampão fosfato (pH 7.0), enquanto as soluções lipossolúveis (1 mmol/L) foram diluídas em uma solução acetona/água (1:1, v/v) contendo 7% de β -cyclodextrina randomicamente metilada. Foram preparadas seis diluições a partir da solução 1 mmol/L e transferiu-se 25 μ L dessas soluções diluídas para os poços da microplaca em triplicata. Em seguida, adicionou-

se 150 μL de fluoresceína 40 nM diluída em 75 mmol/L de tampão fosfato (pH 7.0). Nessa microplaca foi feito um branco (200 μL de solvente), um controle (25 μL solvente + 150 μL de fluoresceína 40 nM), e uma série de diluições de Trolox (150 μL de fluoresceína 40 nM + 25 μL da diluição de Trolox). A microplaca foi incubada após adicionar 300 μL de água destilada nos poços ao redor das amostras, a fim de manter uma temperatura homogênea na placa durante a leitura. Após incubação a 37°C/30 minutos adicionou-se 25 μL de AAPH (153 mmol/L em 75 mmol/L de tampão fosfato, pH 7.0) em todos os poços, com exceção do branco. A microplaca foi, novamente, incubada no leitor de placas (Multi-Detection microplate reader, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT) e a placa foi agitada a cada 10 segundos na intensidade máxima. O leitor foi programado para medir a fluorescência a cada minuto, durante 60 minutos. Após esse período, foi feita a integração da área sob a curva de decaimento da fluorescência utilizando o software Gen5. O valor de área foi subtraído da área do branco (200 μL de solvente), e, em seguida, da área do controle (25 μL de solvente + 150 μL de fluoresceína 40 nM + 25 μL de AAPH). O valor ajustado para cada amostra correspondeu à área líquida sobre a curva. Anteriormente, uma curva de calibração foi feita com trolox e expressa como área líquida vs. concentração ($\mu\text{mol/L}$). Assim, a atividade antioxidante das amostras foi expressa como Trolox equivalente ($\mu\text{mol TE}$).

$$\text{Net AUC (lipo)} = 311.790,70 [\text{Trolox } \mu\text{mol}] + 2968681,71$$

$$\text{Net AUC (hidro)} = 365.477,44 [\text{Trolox } \mu\text{mol}] + 2220027,17$$

O mesmo procedimento foi aplicado para cada amostra de antioxidante em cada concentração de diluição. O valor TE obtido foi, então, dividido pela respectiva concentração da diluição, e a média das seis diluições foi adotada como resultado final (TE μmol).

2.8 Capacidade redutora do Fe^{+3} / Poder antioxidante - FRAP (*Ferric reducing ability*)

A metodologia foi conduzida de acordo com Benzie & Strain (1996). O método mede a capacidade da amostra em reduzir $[\text{Fe}^{+3}\text{-TPTZ}]$ a $[\text{Fe}^{+2}\text{-TPTZ}]$, o qual apresenta cor azul ($\lambda = 593 \text{ nm}$). Para tal, prepararam-se os seguintes reagentes:

tampão acetato 300 mmol/L em pH 3.6 (3.1 g de acetato de sódio trihidratado foi dissolvido em 16 mL de ácido acético glacial e o volume final de 1.0 L completado com água destilada); solução de TPTZ 10 mmol/L 2,4,6-tripiryridyl-s-triazine (TPTZ) em HCl 40 mmol/L e solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mmol/L em água destilada. O reagente FRAP foi preparado, diariamente, a partir da mistura de 25 mL de tampão acetato com 2.5 mL de solução TPTZ e 2.5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Primeiramente, 3.0 mL da solução FRAP foram misturadas com 100 μL da amostra teste (diluição final 1/30). A absorbância inicial ($\text{Abs}_{\text{T}0}$) foi anotada e a leitura a 593 nm prosseguiu durante 6 min ($\text{Abs}_{\text{T}6}$) descontando-se o valor do branco reagente (água destilada) em temperatura ambiente utilizando-se um espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu Corporation, Nakagyo-ku, Kyoto, Japan). A diferença entre os valores de absorbância ($\Delta A_{593\text{nm}} = \text{Abs}_{\text{T}6} - \text{Abs}_{\text{T}0}$), foi calculada para cada amostra. Uma solução com concentração conhecida de Fe^{2+} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foi usada para calibração do método. A variação da concentração (100 - 1000 $\mu\text{mol/L}$) mostrou um comportamento linear de absorbância, e estes valores foram usados para calcular a curva padrão: $\lambda_{593\text{nm}} = 0.7 \times 10^{-3} [\text{Fe}_2\text{SO}_4 \mu\text{mol/L}] - 7.8 \times 10^{-3}$ ($r = 0.99$, $p < 0.05$). Esta curva foi usada para calcular a diferença entre os valores de absorbância ($\Delta A_{593\text{nm}} = \text{Abs}_{\text{T}6} - \text{Abs}_{\text{T}0} = 0.705$) e, em seguida, para cálculo do valor FRAP. O valor FRAP das amostras foi calculado da seguinte forma: *Valor FRAP* = $(\Delta A_{593\text{nm}} \text{ amostra} / \Delta A_{593\text{nm}} \text{ Fe}_2\text{SO}_4 \text{ a } 1000 \mu\text{mol/L}) \times 1000 \mu\text{mol/L}$.

Desta forma, um maior valor FRAP correspondeu a maior concentração de Fe^{2+} e, conseqüentemente, maior a capacidade da amostra em reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} . Todas as amostras foram avaliadas na concentração 1.0 mmol/L e os resultados expressos como Trolox equivalente (TE mmol/L), baseados na curva de calibração preparada nas mesmas condições: $TE \text{ (mmol/L)} = -0.0187 + 0.001 \cdot \text{Valor FRAP}$, ($r = 0.99$, $p < 0.01$).

2.9 Análise estatística aplicada à primeira fase da pesquisa

As análises foram conduzidas em triplicata e os resultados expressos como média. A variação dos ensaios foi expressa como desvio padrão conjunto. Inicialmente submeteu-se todos os valores à análise de homogeneidade das variâncias (teste de Hartley) e análise de variância - Kruskal-Wallis ANOVA), adotando-se 0.05 como valor α . O mesmo procedimento estatístico foi usado para

agrupamento da Análise de Cluster. A análise em Componentes Principais (PCA), seguida da análise de Cluster foi aplicada aos dados. Os autovalores maiores que 1.0 foram selecionados para discutir os resultados. A projeção das variáveis (métodos), e dos casos (amostras), no plano fatorial, foi conduzida com base nas duas primeiras componentes principais. As análises foram baseadas na correlação e a variância foi computada como $SS/(n-1)$. Para análise de Cluster, o método tree-Clustering foi usado para identificar os casos pertencentes a cada grupo. Essa análise foi baseada no método *Ward's* e na distância Euclideana. Todas as análises estatísticas foram conduzidas no software STATISTICA v.7 (Statsoft Inc., Tulsa, OK).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, os compostos foram selecionados com o objetivo de incluir estruturas moleculares, tais como fenólicos (incluindo fenóis, ácidos fenólicos, diterpenos fenólicos, isoflavonas, flavonois, flavonoides e stilbenóides), ácidos orgânicos, sais orgânicos, fosfolipídeos, tióis, amino ácidos, tocóis derivativos e pigmentos incluindo carotenóides e xantofilas, a fim de identificar quais as características químicas poderiam ser associadas à atividade antioxidante mensurada a partir de diferentes mecanismos.

3.1 Análise unidimensional

Os compostos que formavam soluções coloridas, tais como licopeno, astaxantina, luteína, β -caroteno, quercetina e rutina, não foram avaliados pelo método de DPPH porque a cor das soluções, mesmo diluída, apresentava interferência nas medidas espectrofotométricas. A **Tabela 1** mostra os resultados de atividade antioxidante obtidos a partir das soluções dos compostos avaliadas por de cinco diferentes metodologias.

O método LAOX baseou-se na oxidação do ácido linoléico (LH) induzida pelo radical AAPH (AAPH[•]), utilizando tampão fosfato (pH 7.4) como solvente na matriz emulsionada. Primeiramente, o azo-iniciador decompõe-se a 37°C ($R_2N_2 \rightarrow 2R^{\bullet} + N_2$) e o radical formado abstrai um átomo de hidrogênio do LH formando então hidroperóxidos (LOOH) e substâncias secundárias, tais como substâncias que

reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Se o antioxidante (AH) estiver ativo nesse meio, ele irá doar ou transferir esse átomo de hidrogênio para o radical, poupando, assim, o ácido graxo e produzindo menos TBARS. Neste estudo, as soluções preparadas com ácido carnósico, ácido cafeico, trolox, BHT, rutina, tocoferol e quercetina, apresentaram maior capacidade em doar átomos de hidrogênio para o radical AAPH ($p < 0.01$) comparando-as com as demais soluções.

Ao analisar os compostos pelo método DPPH, a maior atividade antioxidante ($p < 0.01$) foi obtida com as soluções de ácido cafeico, eritorbato de sódio, ácido ascórbico, trolox e tocoferol (**Tabela 1**). A cinética da reação desses compostos com o DPPH está ilustrada na **Figura 1**. Nesse método o radical DPPH[•] encontra-se diluído em solvente orgânico (etanol) e absorve em um comprimento de onda de 515 nm. Se o AH for capaz de doar átomos de hidrogênio para a molécula de radical DPPH[•] por uma via de reação secundária (FOTI et al., 2004) a absorbância se reduz de acordo com a eficiência do composto $DPPH^{\bullet} + AH \rightarrow A^{\bullet} + DPPHH$. Nessa análise o AH não irá competir com outras moléculas para reagir com o DPPH[•].

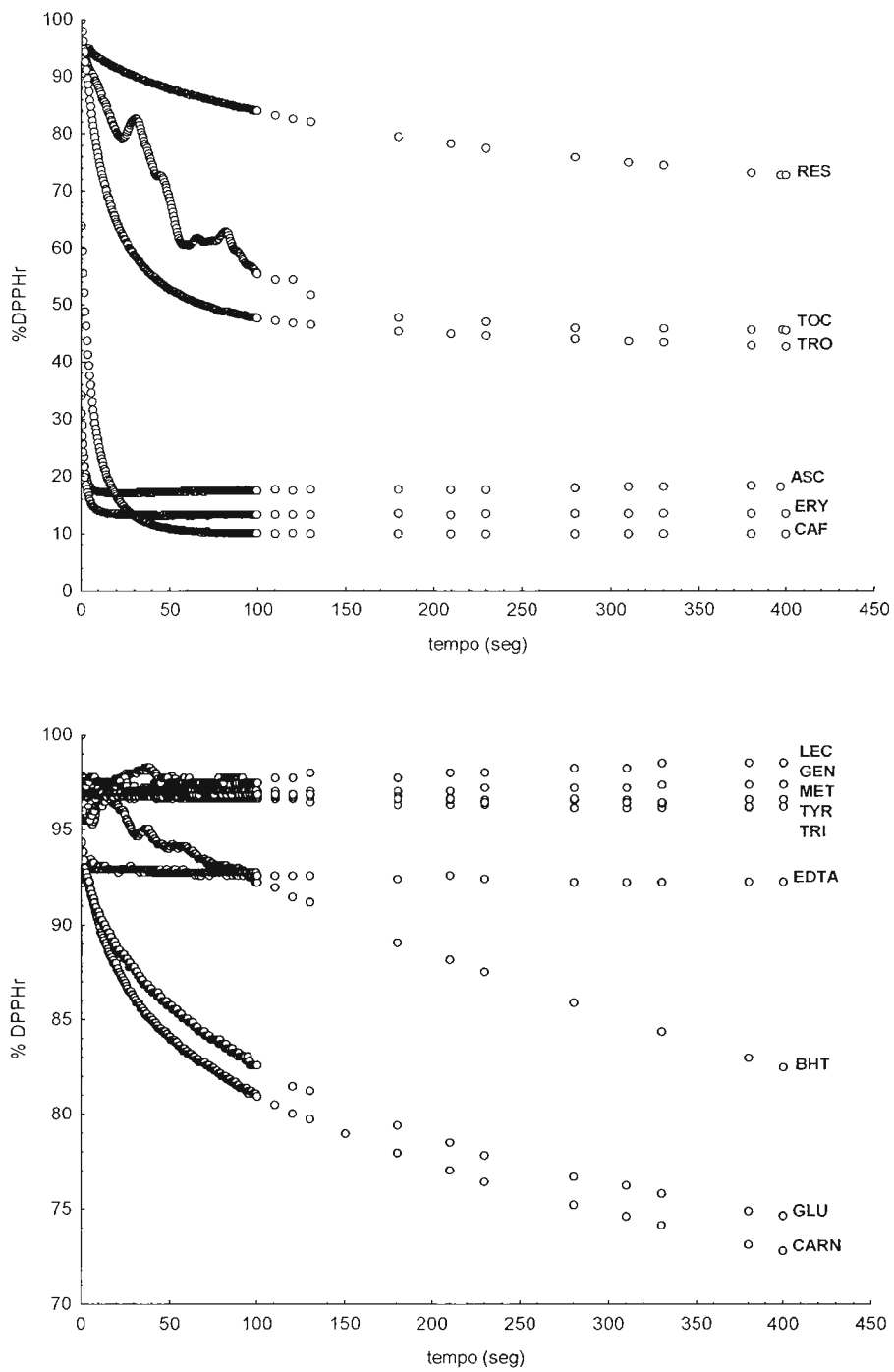


Figura 1. Curvas de cinética de decaimento dos compostos analisados pelo método DPPH. Valores expressos com média (n=3).

Tabela 1 Atividade antioxidante das amostras avaliadas a partir de diferentes metodologias *in vitro* e expressa como Trolox equivalente (TE)^f

Amostra ^a	Abreviatura	Tipo de molécula	Solvente	LAOX (mM TE)	DPPH (mM TE)	TBARS (mM TE/ml)	ORAC (μM TE)	FRAP (mM TE)	Peso molecular (g) ^b	Hidroxiilas (unid) ^b	Anéis fenólicos (unid) ^b	Estrutura catecólica (unid) ^b
Ácido ascórbico	ASC	ácido orgânico	água	0.03	2.14	0.18	0.56	2.16	176.1	4	0	0
Astaxantina	ASX	carotenóide	etanol	^d	^d	0.00	0.05	0.28	596.9	2	0	0
BHT	BHT	fenol	etanol	0.51	0.08	1.90	0.00	0.37	220.4	1	1	0
Ácido caféico	CAF	ácido fenólico	água	0.95	2.67	0.30	7.29	2.09	180.2	3	1	1
Ácido carnósico	CARN	diterpeno	água	1.27	0.13	0.11	0.11	0.29	332.4	2	1	1
Caroteno	CAR	carotenóide	etanol	^d	^d	0.18	^e	0.30	536.9	0	0	0
Ácido cítrico	CIT	ácido orgânico	água	0.04	0.03	0.12	0.00	0.20	192.4	4	0	0
EDTA	EDTA	sal orgânico	água	0.09	0.03	0.09	0.00	0.26	372.2	4	0	0
Eritorbato	ERY	sal orgânico	água	0.04	2.31	0.17	0.31	2.18	198.1	3	0	0
Genisteína	GEN	isoflavona	etanol	0.03	0.02	0.18	4.38	0.23	270.2	3	2	1
Glutamina	GLU	tiol	água	0.12	0.16	0.47	0.28	0.23	307.3	2	0	0
Lecitina	LEC	fosfolípideo	etanol	0.03	0.02	0.00	0.00	0.23	776.0	0	0	0
Luteína	LUT	carotenóide	etanol	^d	^d	0.07	0.21	2.74	568.9	2	0	0
Licopeno	LYC	carotenóide	etanol	^d	^d	0.00	^e	0.38	536.9	0	0	0
Metionina	MET	amino ácido	água	0.02	0.03	0.09	0.72	0.20	149.2	1	0	0
Quercetina	QUE	flavonol	DMF ^c	0.17	^d	2.03	6.88	3.42	338.3	5	2	2
Resveratrol	RES	stilbenóide	água	0.03	0.14	1.05	4.98	0.56	228.2	3	2	1
Rutina	RUT	flavonóide	DMF ^c	0.35	^d	0.00	10.23	2.62	610.5	10	2	2
Tocoferyl	TOC	tolcol derivativo	etanol	0.32	1.02	0.38	0.97	2.22	430.7	1	1	0
Trolox	TRO	tolcol derivativo	água	0.87	1.01	2.35	1.00	1.36	250.3	2	1	0
Triptofano	TRYP	amino ácido	água	0.01	0.02	0.10	4.39	0.26	204.2	0	0	0
Tirosina	TYR	amino ácido	água	0.04	0.02	0.15	0.79	0.26	181.2	2	1	0
Desvio padrão conjunto		-	-	0.39	0.93	0.70	0.48	0.95	-	-	-	-

^a Todas as amostras foram avaliadas na concentração de 1mmol/L e os resultados expressos em Trolox equivalente (TE); ^b Características químicas de acordo com Halliwell & Gutteridge (2004); ^c Dimetilformamida:água (1:1 v/v); ^d Compostos com cor ou pigmentos não foram avaliados pelos métodos DPPH e/ou LAOX; ^e Alta variabilidade observada nos resultados destes compostos; ^f TE: μmol/L ou mmol/L de Trolox necessário para alcançar a mesma atividade de concentração (μmol/L ou mmol/L), quanto maior o valor de TE, maior a atividade antioxidante (Pérez-Jiménez et al., 2008)

A capacidade redutora, avaliada pelo método FRAP apresentou uma classificação diferenciada para as soluções (**Tabela 1**). Ou seja, observou-se um maior poder redutor para os seguintes compostos: quercetina, rutina, eritorbato de sódio, ácido cafeico, luteína, tocoferol, ácido ascórbico e trolox ($p < 0.01$). A capacidade em doar elétrons para o complexo TPTZ- Fe^{+3} está diretamente associada à atividade antioxidante do composto e, assim como no método DPPH, o FRAP não apresenta nenhum outro competidor no meio de reação.

Os resultados obtidos a partir do método ORAC (**Tabela 1**) mostraram que os antioxidantes que apresentaram maior eficiência foram: rutina, ácido cafeico, quercetina, resveratrol, genisteína e triptofano ($p < 0.01$). Os valores de ORAC para o licopeno e β -caroteno não foram apresentados, pois se observou uma grande variabilidade nas replicatas, podendo ser atribuída a problemas de solubilidade desses compostos. Resumidamente, no método ORAC, o radical gerado pelo AAPH reage com a molécula de fluoresceína (3,6'-dihidroxi-spiro[isobenzofurano1[3H],9'[9H]-xantano]-3-ona), reduzindo a emissão de fluorescência (OU et al., 2001).

Trolox, quercetina e BHT apresentaram maiores valores de atividade antioxidante (**Tabela 1**) quando avaliados pelo método TBARS ($p < 0.01$). O princípio desse método é similar ao LAOX, porém o substrato usado é mais complexo, pois trata-se de uma matriz alimentícia composta de ácidos graxos, antioxidantes, pró-oxidantes, proteínas, metais e enzimas. Nessa metodologia, o AH transfere átomos de hidrogênio para os radicais lipídicos, reduzindo, assim, a produção de hidroperóxidos e TBARS.

Conforme descrito previamente por Wu et al. (2004), é evidente que a atividade antioxidante dos compostos depende diretamente do método aplicado na avaliação. Pérez-Jimenez et al. (2008) sugerem que os resultados da atividade antioxidante sejam comparados apenas quando um mesmo método é utilizado, pois a classificação de cada composto irá variar de acordo com a metodologia. Por esta razão, é importante aplicar mais de duas metodologias para avaliar a atividade antioxidante, principalmente quando se trata de novas substâncias. Utilizando a análise univariada nesse estudo, observaram-se cinco diferentes classificações. Não existe nenhum consenso em relação à melhor metodologia para se avaliar o comportamento de um novo composto. Gráficos tridimensionais permitem visualizar

o desempenho antioxidante dos compostos utilizando-se três metodologias. Recentemente Tabart et al. (2008), propuseram a utilização da média ponderada para expressar os resultados obtidos através de diferentes metodologias (incluindo DPPH e ORAC), a fim de padronizar a atividade antioxidante dos compostos. Porém, neste trabalho, sugere-se que as técnicas estatísticas de análise multivariadas possam ser uma melhor alternativa para classificar os resultados de acordo com a atividade antioxidante analisada por cinco diferentes metodologias.

3.2 Análise multi-dimensional

A técnica estatística de análise multivariada foi utilizada para agrupar os compostos e visualizar as interações entre as estruturas moleculares e a atividade antioxidante de 16 das 22 amostras, considerando todos os resultados com a mesma relevância. Assim, a análise multivariada utilizada nesse trabalho permitiu visualizar a associação entre a estrutura molecular e a habilidade dos compostos em reagir com cinco diferentes radicais. De acordo com as técnicas de PCA e análise de *Cluster* todos os compostos deveriam ter sido analisados nas cinco metodologias. No entanto, como os seis compostos coloridos (licopeno, luteína, β -caroteno, astaxantina, quercetina e rutina) não foram avaliados nos métodos DPPH e LAOX, os mesmos precisaram ser excluídos da PCA.

A variância total explicada pelos três primeiros componentes foi de 75.7%, com autovalores de 2.7, 2.0 e 1.4. A análise de Cluster, aplicada à essas variáveis (**Figura 2**), mostrou associação entre os métodos TBARS e LAOX e uma correlação significativa entre os métodos DPPH e FRAP ($r = +0.93$, $p < 0.01$). De acordo com o trabalho de Gil et al. (2002), houve correlação ($r > +0.90$, $p < 0.05$) entre a atividade antioxidante de amostras de frutas analisadas pelos métodos DPPH e FRAP. Neste trabalho, não foi encontrada nenhuma correlação do método ORAC com as demais metodologias avaliadas. Tabart et al. (2008) também não observaram correlação entre dados de DPPH e ORAC para diferentes classes de fenólicos. Observou-se uma forte correlação entre o número de anéis fenólicos ($r = +0.52$, $p = 0.04$) e a presença de estrutura catecólica ($r = +0.67$, $p < 0.01$) com os resultados obtidos a partir do método ORAC. A maior diferença entre os três grupos de métodos formados (TBARS e LAOX; DPPH e FRAP; ORAC) deve-se à presença de uma molécula competidora oxidável no substrato utilizado. Ou seja, enquanto no TBARS

e no LAOX os compostos competem com os ácidos graxos para doar hidrogênio ao radical, no método ORAC o antioxidante compete com a fluoresceína. Já nos métodos DPPH e FRAP não existe nenhum competidor no meio de reação.

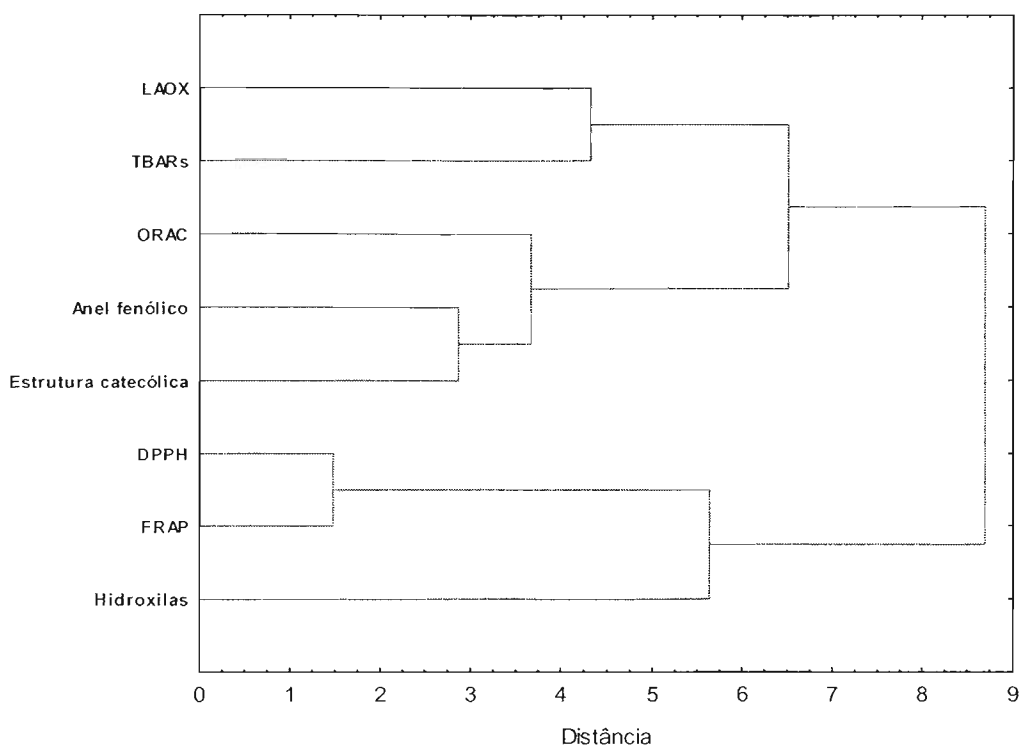


Figura 2. Análise de cluster aplicada às variáveis.

A **Figura 3** mostra a projeção dos compostos no plano fatorial (1x2). A explicação dessa dispersão pode ser visualizada na **Tabela 2** e é baseada na própria projeção das variáveis. Neste caso, as variáveis que contribuíram para o fator 1 foram LAOX (-0.57), ORAC (-0.72), número de anéis fenólicos (-0.71) e presença de estrutura catecólica (-0.80). Para o Fator 2, contribuíram o DPPH (+0.82) e o FRAP (+0.80), enquanto TBARS (-0.81) contribuiu para o Fator 3, o qual foi projetado acima do eixo do plano. Isto significa que os compostos foram separados no eixo horizontal (Fator 1) pela atividade antioxidante obtida nos métodos LAOX e ORAC, no eixo vertical (Fator 2) pelos valores obtidos a partir dos métodos DPPH e FRAP e o terceiro eixo (Fator 3, fora do plano) a partir dos resultados obtidos com a metodologia TBARS.

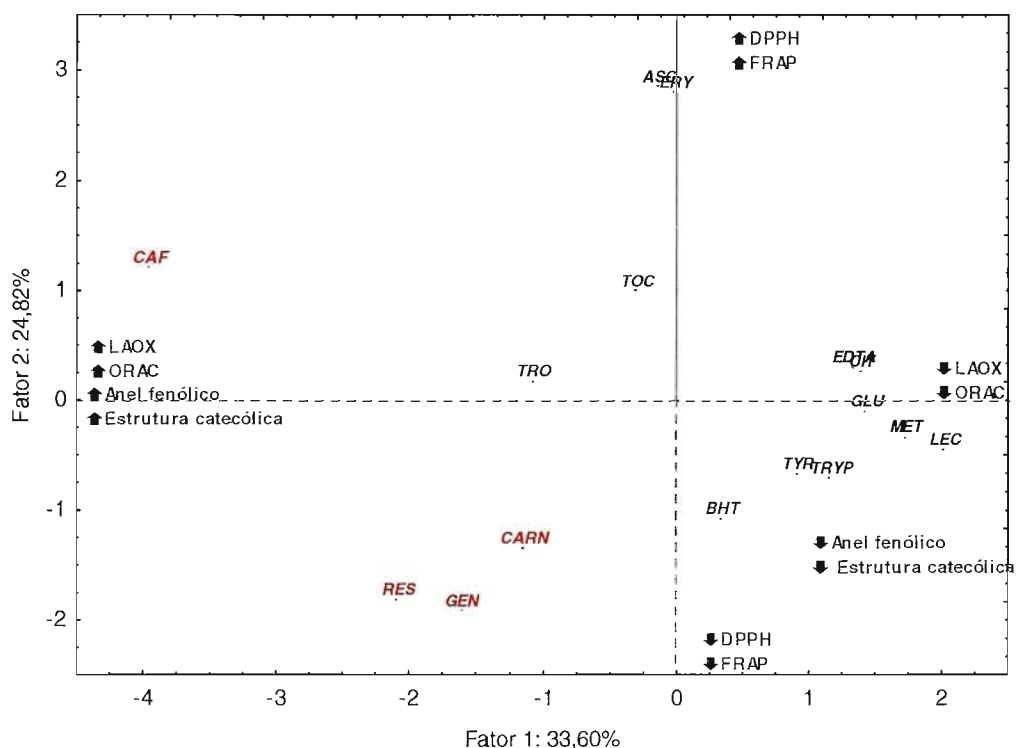


Figura 3. Projecção dos casos no plano factorial (1 x 2). Variáveis ativas: DPPH, FRAP, ORAC, LAOX e TBARS, número de hidroxilas (OH), número de anéis fenólicos e peso molecular (PM).

Tabela 2. Correlação das variáveis fatoriais baseadas na correlação entre elas.

Variáveis	Fator 1	Fator 2	Fator 3
LAOX	- 0.57	- 0.07	- 0.53
DPPH	- 0.53	0.82	- 0.04
TBARS	- 0.26	- 0.18	- 0.81
ORAC	- 0.72	- 0.19	0.35
FRAP	- 0.49	0.80	- 0.16
Número de hidroxilas	- 0.33	0.35	0.43
Número de anéis fenólicos	- 0.71	- 0.54	- 0.05
Número de estrutura catecólica	- 0.80	- 0.41	0.32

De acordo com a análise de Cluster, os compostos foram divididos em 3 grupos (**Tabela 3**). Os grupos apresentaram diferenças significativas em todos os

métodos exceto no LAOX ($p=0.29$), sendo os compostos do Cluster I (ácido ascórbico, eritorbato, tocoferol, BHT e trolox) e do Cluster II (ácido cafeico, ácido carnósico, genisteína e resveratrol) caracterizados pela alta atividade antioxidante nos métodos DPPH, FRAP e TBARS, quando comparados ao Cluster III (triptofano, ácido cítrico, EDTA, glutatutona, lecitina, metionina e tirosina). Os valores do ORAC presentes no Cluster II foram significativamente maiores ($p=0.02$), que os valores observados no Cluster I e III.

Tabela 3. Atividade antioxidante dos compostos classificados pela análise de Cluster avaliados por diferentes metodologias *in vitro* expressos em Trolox equivalente (TE)

Clusters	Compostos ¹	LAOX	DPPH	TBARS	ORAC	FRAP
		[mM TE]	[mM TE]	[mM TE/ml]	[μ M TE]	[mM TE]
I	Ácido ascórbico, eritorbato, tocoferol, BHT e trolox	0,35 \pm 0,35	1,31 \pm 0,92 ^a	1,00 \pm 1,05 ^a	0,57 \pm 0,43 ^a	1,66 \pm 0,80 ^a
II	Ácido cafeico, ácido carnósico, genisteína e resveratrol	0,57 \pm 0,64	0,74 \pm 1,29 ^a	0,41 \pm 0,43 ^a	4,19 \pm 3,00 ^b	0,79 \pm 0,88 ^a
III	Triptofano, ácido cítrico, EDTA, glutatutona, lecitina, metionina e tirosina	0,05 \pm 0,04	0,04 \pm 0,05 ^b	0,15 \pm 0,15 ^b	0,88 \pm 1,58 ^a	0,23 \pm 0,03 ^b
<i>P</i> ²		0.29	0.03	0.03	0.02	<0.01

¹Todos os compostos foram avaliados na concentração final de 1mmol/L e os resultados foram expressos como Trolox equivalente (TE), exceto para o TBARS, no qual os compostos foram analisados na concentração final de 0.1 mg/g homogenato.

²Valores de probabilidade obtidos pelo teste Kruskal Wallis. Valores da mesma coluna seguidos pela mesma letra não apresentaram diferença significativa ($p<0.05$)

Os compostos presentes no Cluster II exibiram maiores valores de atividade antioxidante, quando analisados pelo método ORAC. O mecanismo de redução do ORAC baseia-se na transferência de átomos de hidrogênio, medindo diretamente a atividade antioxidante de compostos considerados *chain-breaking* contra os radicais peroxila (OU et al. 2001). A **Figura 4** mostra a estrutura molecular desses compostos. No método ORAC o azo-iniciador AAPH se decompõe a 37°C formando $N=N + 2$ moléculas de radical (AAPH[•]). Na presença de oxigênio, o radical (ROO[•])

pode reagir diretamente com a fluoresceína produzindo compostos estáveis que não emitem fluorescência, ou pode reagir com o antioxidante (AH) e produzir compostos estáveis ($\text{ROOH} + \text{A}^\bullet$) reduzindo assim a emissão da fluorescência. Portanto, sugere-se que os compostos do Cluster II apresentaram alta capacidade de reagir com o radical (ROO^\bullet) e essa propriedade está fortemente associada ao número de anéis fenólicos e estrutura “catecólica ou resorcinólica”. A substituição na posição *para* do grupamento hidroxila do anel fenólico associada à cadeia lateral conjugada assim como a substituição *ortho*-difênolica e *mono* ou dihidroximetilação da estrutura, normalmente aumentam a capacidade antioxidante de compostos fenólicos (BRAVO et al., 2007). Assim, de acordo com Tabart et al. (2008), a diferença entre os compostos fenólicos pode ser melhor explicada pela sua estrutura do que pela classificação a qual pertencam.

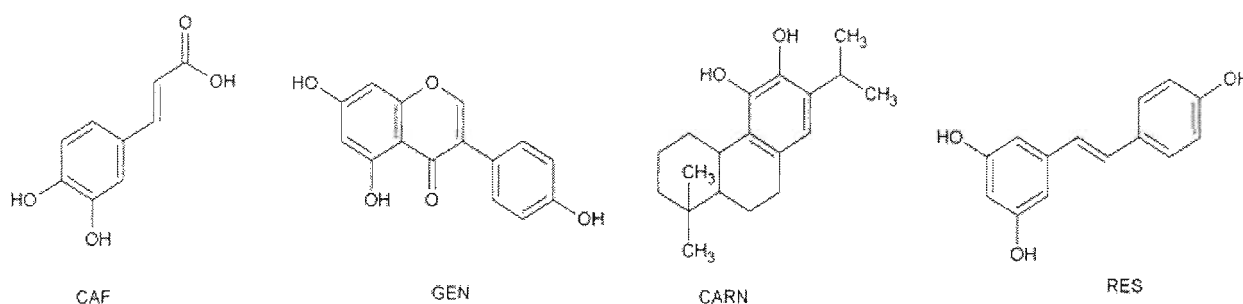


Figura 4. Estrutura molecular dos compostos pertencentes ao Cluster II (CAF- ácido cafeico; GEN- gensiteína; CARN- ácido carnósico; RES- resveratrol)

Os compostos presentes no Cluster I (ácido ascórbico, eritorbato, tocoferol, BHT e trolox) apresentaram uma tendência a maior atividade antioxidante, comparando-os aos outros compostos, quando avaliados pelos métodos DPPH, FRAP e TBARS, conforme relatam outros trabalhos (LAGUERRE et al., 2007; BRAND-WILLIAMS, et al., 1995; LIU et al., 2008; ALAMED et al., 2006). O ácido cafeico ficou distanciado do Cluster I, devido a sua eficiência observada no método ORAC. De acordo com Sousa et al. (2004), a oxidação do ácido cafeico apresenta um mecanismo redox reverso, que não é observado durante a oxidação de outros compostos fenólicos que apresentam o grupamento hidroxila na posição orto.

4 CONCLUSÕES

A aplicação de técnicas estatísticas multivariadas sugeriu que entre os compostos que apresentaram maior atividade antioxidante, a partir dos métodos DPPH, FRAP e TBARS, aqueles classificados como fenólicos no Cluster II (ácido cafeico, ácido carnósico, genisteína e resveratrol) foram os que também mostraram melhor desempenho em reagir com radicais no método ORAC. Essa propriedade apresentou correlação significativa com o número de anéis fenólicos e estrutura catecólica presentes nessas moléculas. Baseando-se na análise multivariada foi possível selecionar os compostos classificados em diferentes Clusters, para explorar o sinergismo entre eles, visando futura aplicação em alimentos.

APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA NO ESTUDO DO SINERGISMO ENTRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS NATURAIS

Resumo

Atualmente, apesar do crescente interesse no uso de antioxidantes naturais em substituição aos antioxidantes sintéticos em produtos alimentícios, essa substituição, ainda, é limitada pelo alto custo. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a interação entre a atividade antioxidante de compostos naturais, para posterior aplicação em produtos alimentícios. Foram preparados dois tipos de misturas, uma contendo três compostos hidrossolúveis (x_1 = ácido cafeico; x_2 = ácido carnósico e x_3 = glutatona) e outra contendo três compostos lipossolúveis (x_1 = quercetina; x_2 = rutina e x_3 = genisteína) de acordo com um planejamento centróide *simplex*. A atividade antioxidante das misturas foi avaliada pelos seguintes métodos: 2,2-diphenyl-2-picryl-hydrazil - DPPH[•]; peroxidação do ácido linoléico induzida pelo azo-indutor 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) – LAOX; determinação de TBARs (*Thiobarbituric acid reactive substances*) em homogenato preparado a base de carne de frango; avaliação do potencial antioxidante *in vitro* pelo método ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity assay*) e capacidade redutora do Fe^{+3} - FRAP (*Ferric reducing ability*). Todos os resultados foram expressos em Trolox equivalente. Foram obtidos modelos polinomiais cúbicos com capacidade preditiva quando a mistura hidrossolúvel foi analisada pelo método LAOX ($\hat{y} = 0.56 x_1 + 0.59 x_2 + 0.04 x_3 + 0.41 x_1x_2 - 0.41 x_1x_3 - 1.12 x_2x_3 - 4.01 x_1x_2x_3$) e quando a mistura lipossolúvel foi avaliada pelo método FRAP ($\hat{y} = 3.26 x_1 + 2.39 x_2 + 0.04 x_3 + 1.51 x_1x_2 + 1.03 x_1x_3 + 0.29 x_2x_3 + 3.20 x_1x_2x_3$). A otimização dos modelos sugeriu uma mistura contendo 47% de ácido cafeico + 53% de ácido carnósico e outra, contendo 67% de quercetina + 33% de rutina, como combinações com potencial sinérgico que podem ser futuramente avaliadas em uma matriz alimentícia.

Palavras-chave: antioxidantes, mistura, oxidação, metodologia de superfície de resposta.

1 INTRODUÇÃO

A oxidação lipídica é a principal limitação para o *shelf life* de diversas preparações, tais como cremes, óleos, emulsões, maioneses e carnes. Além do sabor desagradável de rancidez, essa reação promove a formação de outros compostos, sendo muitos deles tóxicos para o organismo humano (SEPPANEN et al., 2002). Uma das formas para evitar essas reações químicas indesejáveis pode ser a partir do uso de embalagens que minimizem o contato do alimento com o oxigênio (NAZ et al., 2005). No entanto, o método mais comum para proteção do alimento é a adição de compostos antioxidantes, principalmente compostos sintéticos. Dentre os mais usados destacam-se o BHA (butilato hidroxil anisola), o BHT (butilato hidroxil tolueno), o TBHQ (terc-butilhidroquinona), o propil galato (PG), o eritorbato de sódio e o EDTA (ácido etileno diamino tetracético).

O risco toxicológico desses compostos, tais como BHA e BHT (SOUBRA et al., 2007; JAYALAKSHMIN et al., 1986), associado a novas tendências de mercado, tais como o “slow food”, os alimentos funcionais e alimentos orgânicos, tem aumentado o interesse das empresas em substituir compostos sintéticos por naturais. Porém, apesar dessa substituição ser tecnologicamente viável, o aspecto econômico pode, muitas vezes, inibir a efetividade dessa mudança. Por essa razão torna-se importante estudar os efeitos da interação entre compostos naturais na melhoria da atividade antioxidante, visando reduzir a quantidade necessária dos compostos para alcançar o mesmo resultado. Portanto, o uso de misturas poderia reduzir o custo, quando comparado a ação de um composto isolado. Devido a complexidade da atividade antioxidante em alimentos, tanto o tipo de antioxidante, quanto a quantidade que deve ser utilizada, são aspectos críticos na redução da oxidação lipídica (HORN, 2009).

A metodologia de superfície de reposta (RSM) é uma técnica, inicialmente introduzida por Box (1900), extensivamente aplicada na indústria de alimentos para desenvolvimento e otimização de novos produtos e processos. Mais tarde, Cornell (1999) sugeriu uma nova aplicação da RSM focando situações que envolviam misturas de compostos. Nesse caso, otimiza-se a proporção de variáveis (x_i), uma vez que $\sum_{i=1}^n x_i = 1$. Sabendo-se que a interação entre diferentes compostos pode

proporcionar resultados não previsíveis, a aplicação da técnica de MSR pode ser uma ferramenta interessante na investigação dessas interações.

Dentre os compostos naturais comercialmente disponíveis, muitos polifenóis apresentam propriedade antioxidante, quando aplicados em óleos ou em emulsões. Diversos estudos atribuem a atividade antioxidante aos flavonols, flavonóides, isoflavonas, diterpenos e ácidos fenólicos, porém, poucos trabalhos relatam estudos com interação dos fenólicos em diferentes sistemas (ERKAN, et al., 2008; IACOPINI et al., 2008; HEO et al., 2007; FRANKEL, 2005; MEYER et al., 1998). Vários métodos têm sido utilizados para avaliar a atividade antioxidante de compostos naturais, porém, deve-se utilizar mais de uma metodologia para avaliar essa atividade, uma vez que os diferentes métodos avaliam características distintas de cada composto (ERKAN, et al., 2008). Pérez-Jimenez et al (2008) recomendam a combinação de diferentes métodos para uma melhor interpretação dos resultados. Alguns dos procedimentos mais utilizados, para determinar a atividade antioxidante de compostos sintéticos e naturais, seriam: capacidade redutora do Fe^{+3} - FRAP (*Ferric reducing ability*); 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH - ABTS); 2,2-diphenyl-2-picryl-hydrazil - DPPH*; avaliação do potencial antioxidante *in vitro* pelo método ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity assay*) e quantificação de produtos formados durante a peroxidação lipídica, através da análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (PÉREZ-JIMENEZ & SAURA-CALIXTO, 2006; THAIPOONG et al., 2006). Recentemente, Capitani et al (2009a), sugeriram correlação significativa entre a atividade antioxidante de compostos quando avaliada pelos métodos DPPH e FRAP, sendo que nenhum deles apresentou correlação com o método ORAC. Como base nesse estudo prévio, os compostos selecionados, para este trabalho, foram aqueles que apresentaram atividade antioxidante elevada ou potencialmente complementar: ácido cafeico, ácido carnósico, quercetina, rutina, genisteína e glutathione.

Considerando-se que a solubilidade é um fator que afeta a atividade antioxidante de compostos naturais, quando aplicados em matrizes alimentícias, procurou-se, neste estudo, modelar e otimizar a atividade antioxidante de uma mistura de compostos hidrossolúveis (ácido cafeico; ácido carnósico e glutathione), e

outra de compostos lipossolúveis (quercetina; rutina e genisteína), utilizando a metodologia de superfície de resposta para alcançar esse objetivo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes adquiridos da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO): Azo-iniciador AAPH ou 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride 97% (44,091-4), ácido linoléico 99% (L1376), DPPH ou 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (D9132), TBA ou 2-ácido tiobarbitúrico 98% (T5500), BHT ou 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol 99% (1378), TCA ou ácido tricloroacético 99% (T4885), TEP ou 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (T9889) e TPTZ ou 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (T1253). Polioxietileno sorbitan monolaurate (Tween 20), acetato de sódio trihidratado e sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram obtidos da Labsynth Ltda (Diadema, SP). Cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) da marca Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, RJ), Dimetilformamida (DMF) da Mallinckrodt J.T.Baker (Griesheim, Germany) e a Trapsol - β -cyclodextrin randomicamente metilada obtida empresa Cyclodextrin Technologies Development Incorporation (High Springs, FL). Os demais reagentes utilizados apresentaram grau de pureza analiticamente compatível. As soluções aquosas foram preparadas utilizando-se água Milli-Q (Millipore Ind. Com. Ltd, Jurubatubam, SP), enquanto os solventes orgânicos foram grau HPLC.

2.2 Preparo das soluções e das misturas

Os antioxidantes hidrossolúveis (glutathiona, ácido carnósico e ácido cafeico) foram dissolvidos em água. A genisteína foi dissolvida em etanol. Rutina e quercetina foram dissolvidas em água e DMF na proporção 1:1 (v/v). Todas as soluções foram preparadas numa concentração de 1 mmol/L. As soluções foram transferidas para um frasco de cor âmbar, lacrados com nitrogênio e armazenados em freezer (-25°C).

Todas as misturas foram preparadas no momento de cada análise. A mistura hidrossolúvel foi preparada a partir do ácido cafeico - CAF (x_1), ácido carnósico - CARN (x_2) e glutathiona - GLU (x_3), enquanto para a mistura lipossolúvel utilizou-se quercetina - QUE (x_1), rutina - RUT (x_2) e genisteína - GEN (x_3). Para avaliar a interação entre os antioxidantes, utilizou-se um planejamento de mistura ternária do tipo "centróide *simplex*". A **Tabela 1** apresenta o delineamento experimental aplicado na avaliação das duas misturas. Cada composto foi avaliado isoladamente, em misturas binárias (dois a dois) e em misturas ternárias (1/3, 1/3, 1/3). Todas as misturas foram preparadas a partir das soluções na concentração 1 mmol/L.

Tabela 1. Delineamento experimental "centróide *simplex*" utilizado na avaliação das misturas hidrossolúvel e lipossolúvel.

	Proporções aplicadas		Volume (μL) de cada amostra em 100 μL de solução		
	HIDRO LIPO		CAF QUE	CARN RUT	GLU GEN
Ensaio	(x_1, x_2, x_3)		x_1	x_2	x_3
1	(1, 0, 0)		100.0	0.0	0.0
2	(0, 1, 0)		0.0	100.0	0.0
3	(0, 0, 1)		0.0	0.0	100.0
4	(0.5, 0.5, 0)		50.0	50.0	0.0
5	(0.5, 0, 0.5)		50.0	0.0	50.0
6	(0, 0.5, 0.5)		0.0	50.0	50.0
7	(0.33, 0.33, 0.33)		33.3	33.3	33.3
8	(0.67, 0.17, 0.17)		67.0	17.0	17.0
9	(0.17, 0.67, 0.17)		17.0	67.0	17.0
10	(0.17, 0.17, 0.67)		17.0	17.0	67.0

Além das sete misturas utilizadas para a modelagem, três pontos axiais foram incluídos no planejamento para futura validação da metodologia.

2.3 Avaliação da atividade antioxidante através de diferentes metodologias

Todas as misturas foram preparadas, diariamente, a partir das soluções 1 mmol/L, e a respectiva atividade antioxidante foi determinada através de três das cinco metodologias utilizadas na primeira fase, descritas previamente no Capítulo 1 deste estudo.

- Peroxidação do ácido linoléico em emulsão induzida pelo azo-iniciador 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) – **LAOX**, inicialmente proposto por Axelrod et al. (1981); e conduzido de acordo com Castro et al. (2006b);
- Capacidade redutora do Fe^{+3} / Poder antioxidante - **FRAP** (*Ferric reducing ability*), seguindo a metodologia descrita por Benzie & Strain (1996);
- Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* pelo método **ORAC** (*Oxygen radical absorbance capacity assay*), utilizando-se o método descrito por Ou et al. (2001) e modificado por Huang et al. (2005).

Ao avaliar a atividade antioxidante, utilizando-se os métodos LAOX e FRAP, todas as misturas foram preparadas obtendo-se um volume final de 100 μL . Por exemplo, na mistura hidrossolúvel pura, uma alíquota (100 μL) foi obtida a partir da solução preparada apenas com ácido cafeico. Para as misturas binárias, uma alíquota foi preparada usando-se 50 μL de ácido cafeico e 50 μL de ácido carnósico e o mesmo procedimento foi adotado para preparo das demais misturas binárias. Finalmente, para as misturas ternárias adotou-se o mesmo procedimento misturando-se, nesse caso, 33.3 μL de cada solução. O preparo das misturas foi baseado no volume, pois todas as soluções foram preparadas na concentração 1 mmol/L.

Já no método ORAC, as misturas foram inicialmente preparadas para um volume final de 300 μL , seguindo o mesmo procedimento das misturas puras, binárias e ternárias descritos para os métodos LAOX e FRAP. A partir dessas misturas, foram feitas seis novas diluições, e uma alíquota de 25 μL de cada diluição foi colocada na microplaca para análise pelo método ORAC.

Todos os resultados foram expressos em TE ($\mu\text{mol/L}$ ou mmol/L), e os cálculos foram conduzidos conforme equações obtidas com trolox nas mesmas condições das análises iniciais.

2.4 Análise estatística

Os resultados obtidos para as misturas hidrossolúvel e lipossolúvel, nos métodos selecionados, foram expressos como média e desvio padrão conjunto,

submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias (*Hartley test*) e à análise de variância (ANOVA), uma vez que a variação entre os ensaios é pressuposto básico para aplicação das técnicas de superfície de resposta.

Os ensaios contendo as misturas puras, binárias e a terciária central (1 a 7) foram utilizados para o ajuste dos modelos polinomiais através da técnica de mínimos quadrados. Partiu-se do modelo mais completo, cúbico especial, no qual: $\hat{y}_i = b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_3 \cdot x_3 + b_{12} \cdot x_1 x_2 + b_{13} \cdot x_1 x_3 + b_{23} \cdot x_2 x_3 + b_{123} \cdot x_1 x_2 x_3$. Onde: \hat{y}_i é a resposta estimada; b_i , o coeficiente estimado e x_i , variáveis dependentes, sendo $1 > x_i > 0$,

$$\sum_{i=1}^n x_i = 1$$

A qualidade do modelo foi avaliada pela ANOVA e a otimização segundo Derringer & Suich (1980). A validação baseou-se em três pontos axiais, para os quais os resultados obtidos experimentalmente foram comparados aos resultados estimados pelos respectivos modelos através do teste-*t*. Todas as análises estatísticas foram conduzidas no software STATISTICA v.7 (Statsoft Inc., Tulsa, OK).

3 RESULTADOS

Nas **Tabelas 2 e 3**, encontram-se descritos os resultados de atividade antioxidante das misturas hidrossolúveis e lipossolúveis, respectivamente, obtidos a partir dos métodos FRAP, ORAC e LAOX, expressos como Trolox equivalente (mmol/L TE ou $\mu\text{mol/L TE}$). Diferenças significativas foram observadas entre as misturas nos três métodos ($p < 0.01$), e, além de uma homogeneidade de variância não significativa, essa é a condição básica para que se possa submeter os resultados à metodologia de superfície de resposta.

Tabela 2. Delineamento experimental “*centróide simplex*” das amostras hidrossolúveis, e respectivos valores de atividade antioxidante expressos em Trolox equivalente (mmol/L ou $\mu\text{mol/L TE}$)

Amostras ¹	Mistura $(x_1, x_2, x_3)^2$	Atividade antioxidante expressa em Trolox equivalente (TE)		
		FRAP	ORAC	LAOX
CAF (x_1)	(1,0,0)	1.75 ^d	4.64 ^d	0.56 ^b
CAR (x_2)	(0,1,0)	0.06 ^a	0.14 ^a	0.59 ^b
GLU (x_3)	(0,0,1)	0.03 ^a	0.30 ^a	0.04 ^a
CAF+CAR	($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{2}$, 0)	1.07 ^b	5.94 ^e	0.68 ^e
CAF+GLU	($\frac{1}{2}$, 0, $\frac{1}{2}$)	2.21 ^e	6.81 ^f	0.20 ^d
CAR+GLU	(0, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{2}$)	0.05 ^a	0.48 ^c	0.03 ^a
CAF+CAR+GLU	($\frac{1}{3}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{3}$)	1.54 ^c	1.01	0.12 ^c
DP	-	0.85	2.36	0.26
p (homogeneidade de variância) ³	-	0.052	0.063	0.684
p (ANOVA) ⁴	-	<0.001	<0.001	<0.001

¹Valores expressos como média ($n=3$). Valores seguidos da mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($p>0.01$).

²Solução (1 mmol/L) de ácido cafeico (CAF), ácido carnósico (CAR) e glutatona (GLU)

³Valores de probabilidade obtida pelo teste Hartley (F_{max})

⁴Valores de probabilidade obtidos pela ANOVA one-way

Tabela 3. Delineamento experimental “*centróide simplex*” das amostras lipossolúveis, e respectivos valores de atividade antioxidante expressos em Trolox equivalente (mmol/L ou $\mu\text{mol/L TE}$)

Amostras ¹	Mistura	Atividade antioxidante expressa em Trolox equivalente (TE)		
		FRAP	ORAC	LAOX
	$(x_1, x_2, x_3)^2$			
QUE (x_1)	(1,0,0)	3.26 ^b	10.10 ^b	0.44 ^{ab}
RUT (x_2)	(0,1,0)	2.39 ^a	9.16 ^b	0.51 ^b
GEN (x_3)	(0,0,1)	0.04 ^c	5.30 ^d	0.05 ^c
QUE+RUT	($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{2}$, 0)	3.21 ^b	4.19 ^c	0.40 ^{ab}
QUE+GEN	($\frac{1}{2}$, 0, $\frac{1}{2}$)	1.91 ^e	1.96 ^a	0.16 ^c
RUT+GEN	(0, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{2}$)	1.29 ^d	1.28 ^a	0.38 ^a
QUE+RUT+GEN	($\frac{1}{3}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{3}$)	2.33 ^a	6.83 ^e	0.49 ^{ab}
DP	-	0.98	2.72	0.14
$p(\text{homogeneidade de variância})^3$	-	0.204	0.523	0.292
$p(\text{ANOVA})^4$	-	<0.001	<0.001	<0.001

¹Valores expressos como média ($n=3$). Valores seguidos da mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($p>0.01$).

²Solução (1 mmol/L) de quercetina (QUE), rutina (RUT) e genisteína (GEN) ³Valores de probabilidade obtida pelo teste Hartley (F_{max})

⁴Valores de probabilidade obtidos pela ANOVA one-way

Em geral, a mistura de ácido cafeico e glutathione apresentou maiores valores de atividade antioxidante, quando analisada pelo método FRAP e ORAC; enquanto a mistura de ácido cafeico e carnósico mostrou o melhor resultado quando analisada pelo método LAOX. Com relação aos compostos lipossolúveis, observou-se que a quercetina, quando isolada ou misturada à rutina apresentou melhor atividade antioxidante pelo método FRAP. Entretanto, a mistura contendo quercetina e rutina apresentou uma resposta antagônica no método ORAC (4.19 $\mu\text{mol/L}$), quando comparada à resposta individual desses compostos (10.10 $\mu\text{mol/L}$ para a quercetina e 9.16 $\mu\text{mol/L}$ para a rutina). Todas as combinações, envolvendo quercetina e rutina, apresentaram melhores valores de atividade antioxidante, quando submetidas ao método LAOX.

A **Tabela 4** apresenta os coeficientes dos modelos polinomiais ajustados à mistura hidrossolúvel. A qualidade de ajuste dos modelos foi avaliada através da ANOVA (significância dos modelos e falta de ajuste), coeficiente de determinação R^2 e, principalmente, por meio da comparação entre valores estimados e observados nos três pontos axiais.

Tabela 4. Coeficientes dos modelos polinomiais (\pm DP) para amostras hidrossolúveis e avaliação da qualidade do ajuste do modelo

Coeficientes dos modelos polinomiais	FRAP	ORAC	LAOX
CAF (β_1)	1.75 \pm 0.02	4.64 \pm 0.05	0.56 \pm 0.01
CAR (β_2)	0.06 \pm 0.02	0.14 \pm 0.04	0.59 \pm 0.01
GLU (β_3)	0.04 \pm 0.02	0.30 \pm 0.03	0.04 \pm 0.01
CAF x CAR (β_{12})	0.66 \pm 0.10	14.19 \pm 0.22	0.41 \pm 0.05
CAF x GLU (β_{13})	5.25 \pm 0.10	17.34 \pm 0.25	-0.41 \pm 0.06
CAR x GLU (β_{23})	-	1.03 \pm 0.17	-1.12 \pm 0.04
CAF+CAR+GLU (β_{123})	7.09 \pm 0.64	-116.18 \pm 1.32	-4.01 \pm 0.37
p (modelo)	<0.001	<0.001	<0.001
p (falta de ajuste)	0.838	FD ³	FD ³
R^2 Ajustado	0.9984	0.9989	0.9972
Valores observados para a mistura ($2/3, 1/6, 1/6$) ¹	1.76 \pm 0.05	3.36 \pm 0.07	0.18 \pm 0.02
Valores previstos para a mistura ($2/3, 1/6, 1/6$)	1.97	4.55	0.37
Teste T para mistura ($2/3, 1/6, 1/6$) ²	0.111	<0.001	0.055
Valores observados para a mistura ($1/6, 2/3, 1/6$) ¹	0.83 \pm 0.04	4.98 \pm 0.07	0.55 \pm 0.04
Valores previstos para a mistura ($1/6, 2/3, 1/6$)	0.69	0.94	0.33
Teste T para mistura ($1/6, 2/3, 1/6$) ²	0.031	<0.001	0.105
Valores observados para a mistura ($1/6, 1/6, 2/3$) ¹	2.17 \pm 0.01	4.99 \pm 0.09	0.09 \pm 0.04
Valores previstos para a mistura ($1/6, 1/6, 2/3$)	1.06	1.28	0.01
Teste T para mistura ($1/6, 1/6, 2/3$) ²	<0.001	<0.001	0.176

¹Valores expressos como média \pm DP ($n=3$) para a mistura contendo CAF+CAR+GLU

² Teste-t

³ Grau de Liberdade não foi suficiente para determinar a falta de ajuste do modelo polinomial

O modelo cúbico, obtido para as misturas hidrossolúveis, foi ajustado para os resultados obtidos com a análise FRAP. Embora esse modelo não tenha apresentado falta de ajuste significativa ($p=0.838$) e tenha apresentado um R^2 elevado ($R_{\text{adj}}^2 = 0.99$), foi observada diferença significativa estimando-se o 3º ponto axial (1/6, 2/3 e 2/3), no qual o valor estimado ($1.06 \mu\text{mol/L}$) diferiu significativamente do valor observado ($2.17 \mu\text{mol/L}$). Desta forma, considerou-se que o modelo não apresenta capacidade preditiva. A mesma situação foi observada no modelo ajustado para os resultados obtidos pelo método ORAC, no qual foram observadas diferenças significativas entre todos os valores estimados e valores obtidos nos pontos axiais. A homogeneidade de variância desses dados (**Tabela 1**) ficaram bem próximas de valores críticos (0.05), sinalizando dificuldade no ajuste do modelo polinomial. Não foi possível avaliar a falta de ajuste para o modelo cúbico ajustado aos resultados obtidos no método LAOX, uma vez que todos os ensaios foram utilizados na construção do modelo. Entretanto, neste último caso, não foi observada nenhuma diferença entre os valores observados experimentalmente e os valores estimados nos três pontos axiais, sugerindo a capacidade preditiva do modelo. Com base nesses resultados, foi realizada a otimização considerando-se apenas o modelo ajustado para os resultados do método LAOX, para o que foi confirmado a capacidade preditiva:

$$\hat{y} = 0.56 x_1 + 0.59 x_2 + 0.04 x_3 + 0.41 x_1 x_2 - 0.41 x_1 x_3 - 1.12 x_2 x_3 - 4.01 x_1 x_2 x_3.$$

A **Figura 1** apresenta a superfície de resposta obtida a partir das misturas analisadas pelo método LAOX. Foi possível observar que um melhor resultado seria obtido a partir da mistura de ácido cafeico com ácido carnósico. A otimização do modelo LAOX (**Figura 2**) sugeriu que a mistura de 47% de ácido cafeico e 53% de ácido carnósico apresentaria uma resposta de atividade antioxidante de 0.68 mmol/L, resultando no sinergismo entre esses dois compostos nessas proporções.

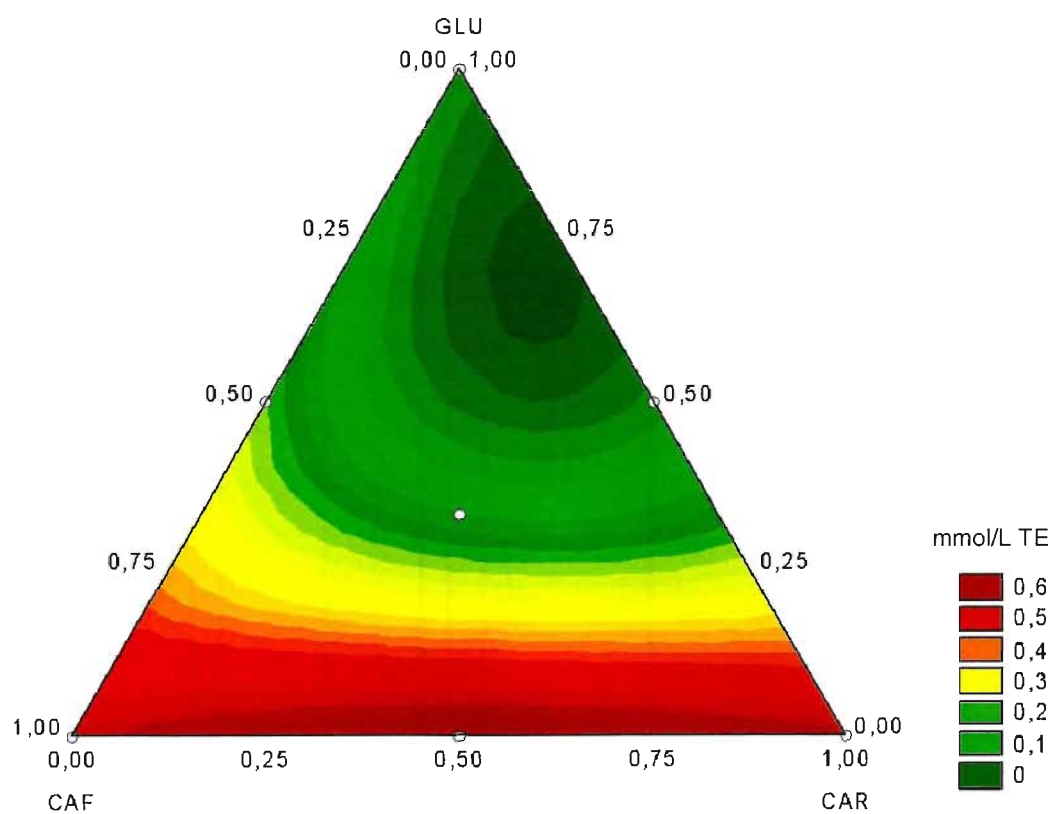


Figura 1. Curva de contorno ilustrando o efeito das proporções na atividade antioxidante do ácido cafeico (CAF), ácido carnósico (CARN) e glutathiona (GLU) avaliadas a partir de inibição da oxidação utilizando-se micelas preparadas com ácido linoléico (método LAOX), expresso em Trolox equivalente (mmol/L TE).

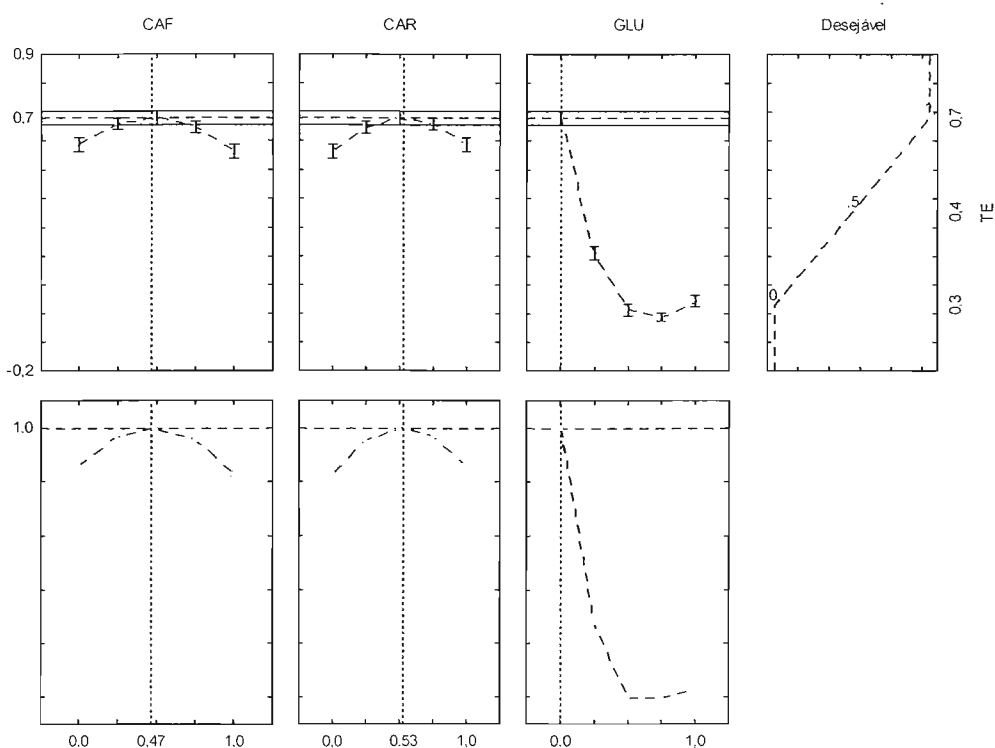


Figura 2. Gráficos dos valores estimados e maximização da atividade antioxidante avaliada pela inibição da oxidação utilizando micelas preparadas com ácido linoléico (método LAOX), expresso em Trolox equivalente (mmol/L TE), referindo-se às misturas contendo ácido cafeico (CAF), ácido carnósico (CAR) e glutaciona (GLU).

Os modelos polinomiais derivados das misturas lipossolúveis estão descritos na **Tabela 5**. Em nenhum dos modelos houve suficientes graus de liberdade para análise da falta de ajuste. O modelo polinomial cúbico ajustado aos resultados obtidos, a partir da metodologia FRAP, apresentou a melhor qualidade de ajuste. Não foi observada diferença estatística significativa entre os valores experimentais e os valores estimados para os três pontos axiais, sendo a diferença entre esses valores muito reduzida (3.05 vs. 2.93; 2.40 vs. 2.43 e 1.28 vs. 1.22 mmol/L). No método ORAC, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os valores experimentais e os valores estimados apenas em um dos três pontos (9.3 vs. 6.64 mmol/L). O mesmo foi observado no método LAOX, no qual observou-se diferença significativa entre os valores experimentais e os valores estimados apenas no 3º ponto axial (0.50 vs. 0.28 mmol/L). Uma vez que apenas modelos com capacidade preditiva devem ser utilizados para otimização o modelo polinomial cúbico baseado nos dados obtidos no método FRAP foi selecionado para a

otimização: $\hat{y} = 3.26 x_1 + 2.39 x_2 + 0.04 x_3 + 1.51 x_1x_2 + 1.03 x_1x_3 + 0.29 x_2x_3 + 3.20 x_1x_2x_3$.

Tabela 5. Coeficientes dos modelos polinomiais (\pm DP) para amostras lipossolúveis e avaliação da qualidade de ajuste dos modelos.

Coeficientes dos modelos polinomiais	FRAP	ORAC	LAOX
QUE (β_1)	3.26 \pm 0.03	10.10 \pm 0.23	0.44 \pm 0.02
RUT (β_2)	2.39 \pm 0.03	9.16 \pm 0.20	0.51 \pm 0.03
GEN (β_3)	0.04 \pm 0.03	5.30 \pm 0.18	0.05 \pm 0.03
QUE x RUT (β_{12})	1.51 \pm 0.13	-21.74 \pm 0.92	-0.30 \pm 0.12
QUE x GEN (β_{13})	1.03 \pm 0.13	-22.95 \pm 1.07	-0.33 \pm 0.12
RUT x GEN (β_{23})	0.29 \pm 0.13	-23.77 \pm 1.23	0.40 \pm 0.11
QUE x RUT x GEN (β_{123})	3.20 \pm 0.91	168.94 \pm 7.21	4.83 \pm 0.85
<i>p</i> (modelo)	<0.001	<0.001	<0.001
<i>p</i> (falta de ajuste)	FD ³	FD ³	FD ³
R ² Ajustado	0.9982	0.9814	0.9481
Valores observados para a mistura (2/3, 1/6, 1/6) ¹	3.05 \pm 0.07	9.30 \pm 0.47	0.30 \pm 0.09
Valores previstos para a mistura (2/3, 1/6, 1/6)	2.93	6.64	0.42
Teste T para mistura (2/3, 1/6, 1/6) ²	0.098	0.010	0.170
Valores observados para a mistura (1/6, 2/3, 1/6) ¹	2.49 \pm 0.10	6.57 \pm 0.52	0.38 \pm 0.08
Valores previstos para a mistura (1/6, 2/3, 1/6)	2.43	6.10	0.51
Teste T para mistura (1/6, 2/3, 1/6) ²	0.386	0.262	0.092
Valores observados para a mistura (1/6, 1/6, 2/3) ¹	1.28 \pm 0.09	3.97 \pm 0.32	0.50 \pm 0.01
Valores previstos para a mistura (1/6, 1/6, 2/3)	1.22	4.07	0.28
Teste T para mistura (1/6, 1/6, 2/3) ²	0.326	0.592	0.019

¹Valores expressos como média \pm DP ($n=3$) para a mistura contendo QUE+RUT+GEN

² Teste-t

³ Grau de Liberdade não foi suficiente para determinar a falta de ajuste do modelo polinomial

A **Figura 3** apresenta a superfície de resposta gerada pelos resultados obtidos através do método FRAP, enquanto a **Figura 4** apresenta a proporção ideal dos compostos otimizados a partir da metodologia descrita por Derringer & Suich

(24). Neste caso, sugere-se que uma mistura contendo 67% de quercetina e 33% de rutina poderia maximizar a atividade antioxidante (3.31 mmol/L).

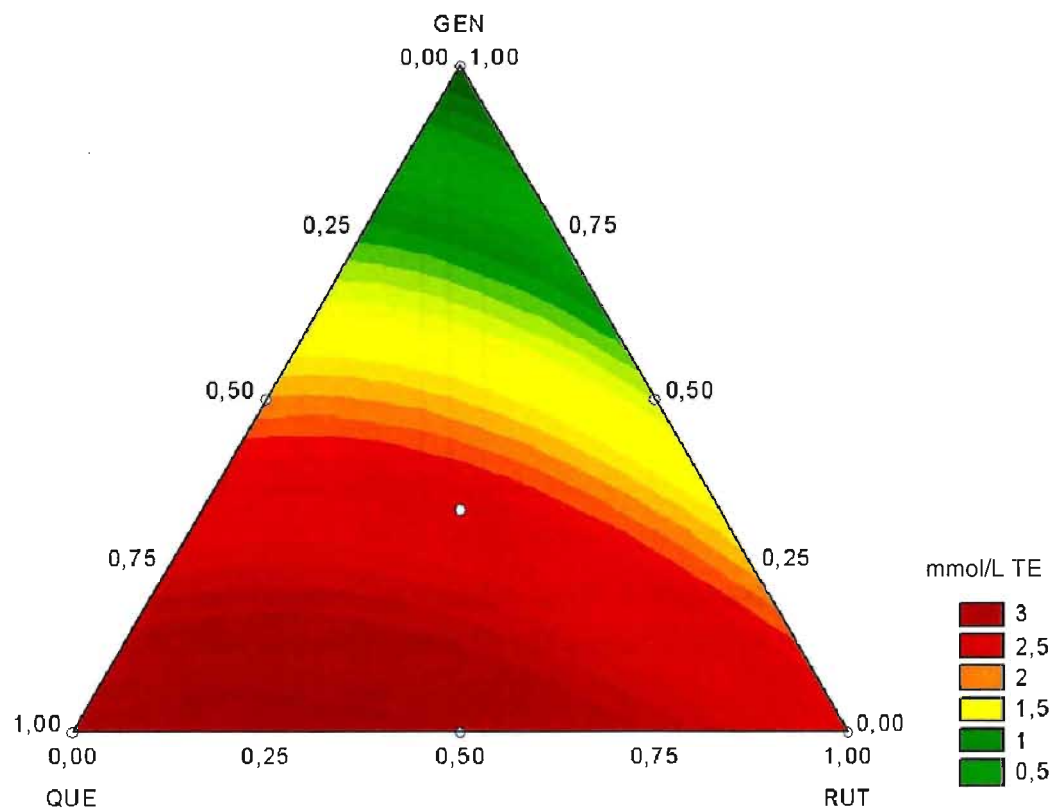


Figura 3. Curvas de contorno ilustrando o efeito das diferentes proporções de quercetina (QUE), rutina (RUT) e genisteína (GEN) avaliadas pelo método FRAP, expressos em Trolox equivalente (mmol/L TE).

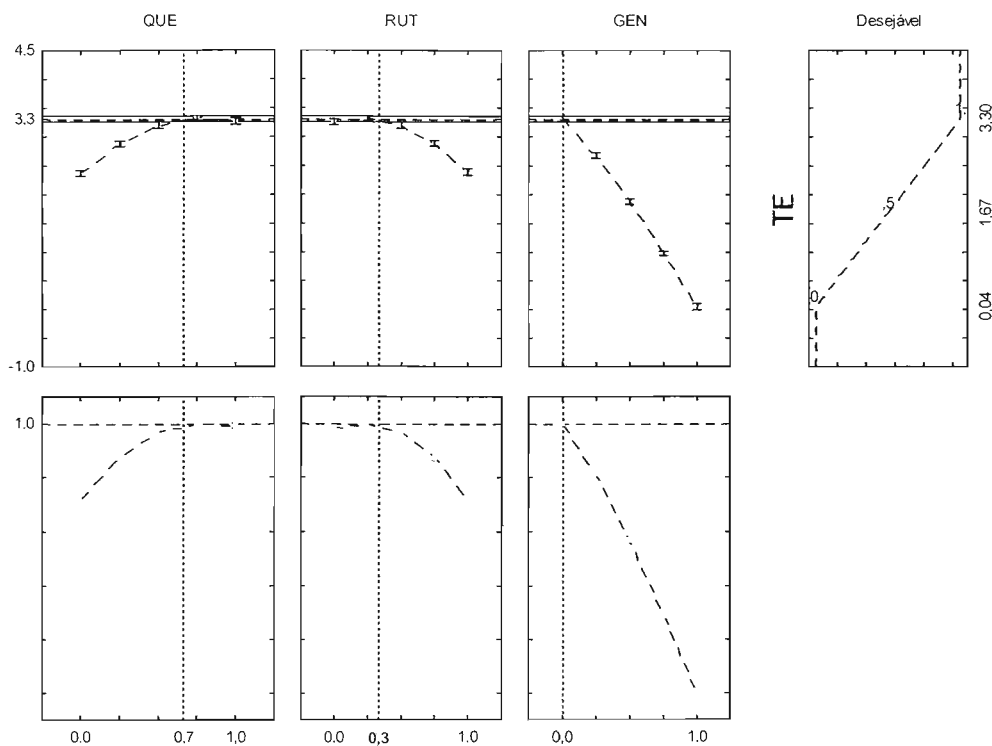


Figura 4. Gráficos dos valores estimados e desejáveis de atividade antioxidante avaliada pelo método FRAP e expresso em Trolox equivalente (mmol/L TE), baseando-se nas misturas contendo quercetina (QUE), rutina (RUT) e genisteína (GEN).

4 DISCUSSÃO

▪ Por que não foi possível ajustar modelos polinomiais para todos os resultados?

A MSR é uma técnica estatística que permite visualizar todas as respostas estimadas para todas as possíveis combinações entre as variáveis através de um gráfico de superfície. Assim, um dos pressupostos, para modelar uma superfície em função da variação das variáveis selecionadas, é que os resultados observados nos ensaios apresentem diferença estatística. Isto significa que os valores de p obtidos a partir da ANOVA *one-way* devem ser menores que 0.05. Esse critério inicial foi obtido nas seis análises feitas neste estudo (**Tabelas 1 e 2**). Após confirmar a variação dos resultados, é possível realizar o ajuste matemático do modelo visando explicar seu comportamento. Porém, quando estão sendo avaliadas reações químicas de novos compostos, é comum que não se consiga adequar nenhum modelo matemático aos dados experimentais. Isto não significa que os dados

estejam incorretos, mas que o comportamento químico requer um modelo mais complexo do que os modelos polinomiais que estão sendo ajustados. Neste trabalho, os melhores resultados, em termos de modelagem, foram observados com os resultados da mistura hidrossolúvel, obtida a partir do método LAOX, e com os resultados das misturas lipossolúveis obtidos no método FRAP. A excelente modelagem obtida no método LAOX para as misturas hidrossolúveis pode ser explicada pelo caráter hidrofílico do azo-iniciador (AAPH), usado nessa metodologia. Nesse caso, o composto hidrossolúvel localiza-se na mesma fase que o radical gerado pelo AAPH.

A oxidação lipídica não pode ser estimada, simplesmente, utilizando-se metodologias *in vitro*. Entretanto, vários compostos têm apresentado alta correlação entre a atividade antioxidante avaliada *in vitro*, e avaliado em métodos mais complexos, como métodos que utilizam matrizes alimentícias. Por exemplo, o eritorbato de sódio, um composto sintético bastante utilizado como antioxidante em salsichas, apresenta alta atividade antioxidante, quando avaliado pelos métodos FRAP e DPPH (CAPITANI et al., 2009a). O método FRAP depende da reação do complexo TPTZ-Fe⁺³ com o antioxidante em condições não fisiológicas (pH 3.6). Nenhum radical oxigênio está envolvido e o método não reage com compostos do tipo tiol como a glutathiona (OU et al., 2001). Nos métodos LAOX e ORAC, a variabilidade dos resultados pode ter sido causada por limitação de solubilidade dos compostos lipossolúveis no meio contendo um azo-iniciador (AAPH).

O ideal de proposta sugerida neste estudo era de otimizar as misturas avaliadas em todas as metodologias. Para isso era necessário que todos os modelos apresentassem capacidade preditiva. Um rigoroso critério foi aplicado na avaliação da qualidade dos modelos. Essa prática, em geral, não precisa ser utilizada na área de ciência dos alimentos, pois o objetivo é, muitas vezes, de discutir o efeito das variáveis na avaliação da resposta. No entanto, neste trabalho, uma alta capacidade preditiva foi exigida, pois a proposta era otimizar a proporção dos compostos e, conseqüentemente, utilizar, futuramente, a mistura otimizada em uma matriz alimentícia.

- Porque foi observado sinergismo entre ácido cafeico e ácido carnósico quando aplicados em micelas?

Sinergismo, antagonismo ou efeito aditivo têm sido bastante relatados pelos estudos que avaliam a atividade antioxidante de misturas contendo compostos fenólicos (IACOPINI et al., 2008; HEO et al., 2007; MEYER et al., 1998) ou não fenólicos (CASTRO et al., 2006a). Os antioxidantes podem quimicamente reduzir um ao outro, atuando em sinergismo para eliminar espécies reativas, e esse exemplo é classicamente conhecido pela mistura de ascorbato, α -tocoferol e glutathiona (BOOT et al., 2008).

Diversos fatores estão envolvidos na atividade antioxidante de compostos fenólicos, tais como grau de atração pelo grupamento OH (ERKAN et al., 2008) e a presença de duplas ligações e grupos cetônicos (RICE-EVANS et al., 1996). Quando aplicados em emulsões ou micelas, outros fatores, tais como pH, presença de metais de transição e tipo de emulsificante influenciam a resposta antioxidante (SORENSEN et al., 2008). Neste estudo a mistura preparada com ácido cafeico e ácido carnósico avaliada pelo método LAOX (micelas preparadas com ácido linoléico), apresentou sinergismo, quando comparada a atividade antioxidante dos compostos isolados (**Figura 1**).

O ácido cafeico (3,4- ácido dihidroxicinâmico) é um ácido fenólico (**Figura 5**) que apresenta eficiente atividade antioxidante agindo como doador de hidrogênio para o azo-iniciador, assim como agente quelante de íons ferroso a partir de suas hidroxilas (HORN et al., 2009; GULÇIN, 2006). A atividade antioxidante do alecrim é atribuída à presença de ácido carnósico, de carnosol e de ácido rosmarínico. O ácido carnósico (**Figura 5**) é um diterpeno fenólico que contém 2 grupos OH-adjacentes ligados à um grupamento carboxila adjacente (ERKAN et al., 2008). Dusch et al. (2008), atribuiu a inibição da formação de hidroperóxidos em óleo de peixe, devido à presença de tocoferol e extrato de alecrim rico em ácido carnósico, enquanto o sinergismo ocorreu em consequência da redução dos radicais tocoferoxilas pelo ácido carnósico.

Ainda não existe uma hipótese para explicar a interação positiva que ocorreu no sistema formado por micelas. Porém, sabe-se que pequenas mudanças na

estrutura molecular dos compostos poderiam modificar, drasticamente, a sua atividade antioxidante, pois levam à alteração de solubilidade e reatividade. Como exemplo, pode-se citar o 4-hidroximetil-2,6-di-terc-butilfenol, que contém apenas uma hidroxila a mais do que o BHT, mas apresenta uma maior solubilidade e atividade na superfície (CHAIYASIT et al., 2005). É possível que essa diferença promova um maior acesso ao azo-iniciador. Exemplificando, pode-se dizer que o caráter hidrofílico do ácido cafeico e do ácido carnósico permite que esses ácidos localizem-se na mesma fase em que se encontra o azo-iniciador (AAPH). Assim, o antioxidante poderia doar átomos de hidrogênio diretamente para o radical peroxila (ROO^\bullet) formado a partir da reação do AAPH com o ácido linoléico. Ambas situações poderiam contribuir para a redução da concentração de TBARS, mensurada no método LAOX. Entretanto, são necessárias mais pesquisas para explicar os reais mecanismos envolvidos nesse efeito, incluindo alteração no potencial de redução na presença dos dois compostos.

▪ **Porque foi observado sinergismo na atividade radical-scavenger entre quercetina e rutina?**

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) é um dos flavonóides mais abundantes em frutas e vegetais, ocorrendo nas formas de agliconas e glicosídeos. A rutina (quercetina-3-ramnosil glicosídeo) é uma das quercetinas mais comuns e foi descoberta primeiramente no grão de trigo (WACH et al., 2007; YANG et al., 2008). A atividade antioxidante da quercetina é atribuída, principalmente, à presença de dois farmacóforos em sua molécula (**Figura 5**), que torna a sua estrutura e configuração excelentes para a atividade radical *scavenger* (grupo catecol no anel B e grupo OH na posição 3 do anel A) (HEIJNEN et al., 2002).

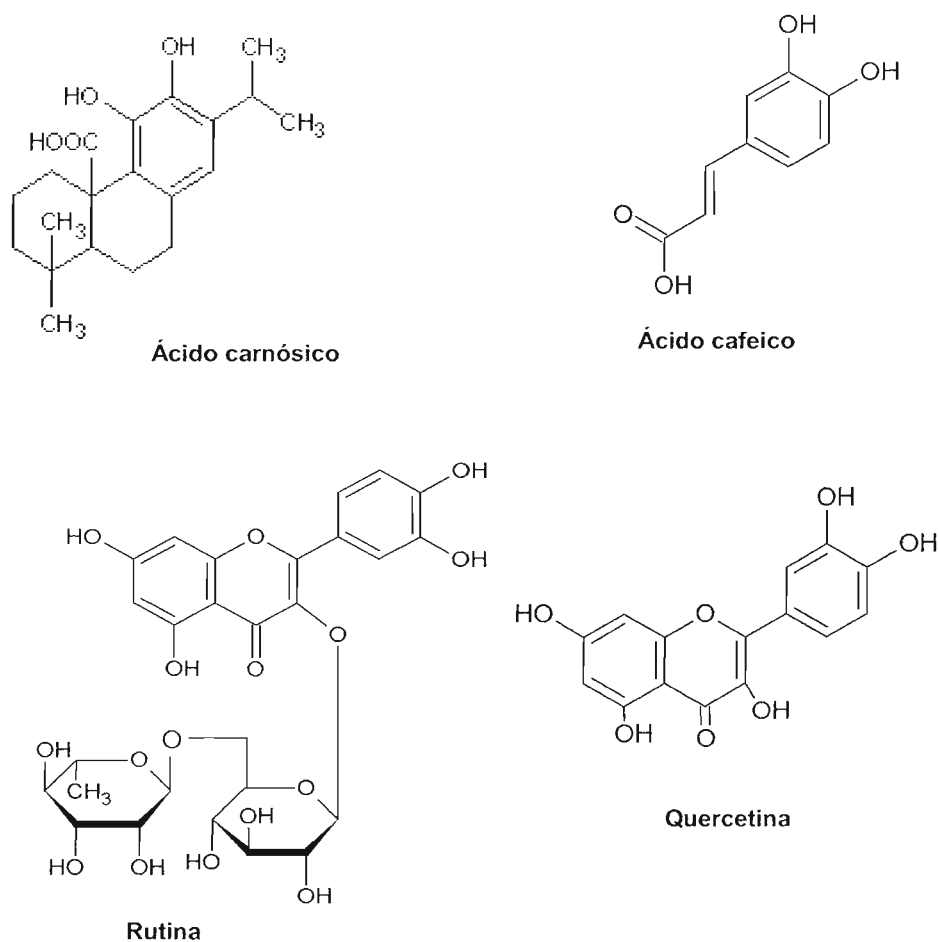


Figura 5. Estrutura molecular dos compostos utilizados para preparo das misturas hidrossolúveis e lipossolúveis

A eficiência antioxidante dos polifenóis depende da capacidade em doar átomos de hidrogênio, que está diretamente relacionada ao número de resíduos hidroxila da estrutura (TURAN et al., 2008; CHAIYASIT et al., 2005). Isso explica a baixa atividade da genisteína, quando comparada com a rutina e quercetina. O modelo polinomial otimizado na **Figura 4**, mostra que em menor concentração a rutina melhora o poder redutor da quercetina, sugerindo que a interação desses dois compostos depende fortemente da proporção de cada um na mistura. A princípio, se apenas a combinação binária (1:1) for analisada, nenhum sinergismo teria sido verificado. No entanto, aplicando a MSR foi possível identificar a proporção entre os dois compostos que resultou em efeito sinérgico da atividade antioxidante:

$$\hat{y} = 3.26 (1.0) = 3.26 \text{ mmol/L, onde } x_1 = 1, x_2 = 0 \text{ e } x_3 = 0;$$

$$\hat{y} = 2.39 (1.0) = 2.39 \text{ mmol/L, onde } x_1 = 0, x_2 = 1 \text{ e } x_3 = 0; \text{ e}$$

$$\hat{y} = 3.26 (0.67) + 2.39 (0.33) + .51 (0.22) = 3.31 \text{ mmol/L, onde } x_1 = 0.67, \\ x_2 = 0.33 \text{ e } x_3 = 0.22$$

Outro importante fator associado a este estudo foi a utilização da mesma concentração molar das soluções nas análises (1.0 mmol/L), permitindo assim a melhor comparação dos resultados.

As avaliações realizadas neste estudo são insuficientes para explicar a razão pela qual a mistura de quercetina e rutina resultou em uma interação positiva no poder redutor do ferro (Fe^{+3}). Porém, conforme explicado, anteriormente, para os compostos hidrofílicos, pequenas diferenças em sua estrutura molecular podem alterar significativamente a solubilidade assim como a presença de diferentes moléculas altera o potencial redutor do meio. A solubilidade pode influenciar o acesso ao sítio de ação e, conseqüentemente, alterar o nível de interação entre o antioxidante e o indutor da oxidação.

5 CONCLUSÕES

Modelos cúbicos foram ajustados aos dados experimentais obtidos a partir da avaliação da atividade antioxidante de misturas de compostos hidrossolúveis pelo método LAOX e para misturas lipossolúveis pelo método FRAP. Este estudo confirmou a hipótese de que a interação entre compostos naturais depende fortemente da razão dos compostos na mistura. A otimização do modelo polinomial sugeriu que as misturas contendo 47% de ácido cafeico e 53% de ácido carnósico ou 67% de quercetina e 33% de rutina apresentaram sinergismo, torando essas combinações potencialmente interessantes para futura aplicação em matrizes alimentícias. Além da redução no custo, o uso de misturas pode proporcionar benefícios sensoriais que devem, sempre, ser considerados em aplicação com alimentos.

APLICAÇÃO DE MISTURAS OTIMIZADAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DE SALSICHAS

RESUMO

A eficiência de compostos naturais, em prevenir a oxidação lipídica em associada ao desenvolvimento de alimentos funcionais, tem despertado grande interesse em produtos com reduzido teor de aditivos ou adicionados de substâncias naturais, consideradas bioativas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi aplicar diferentes proporções de misturas contendo antioxidantes naturais numa emulsão alimentícia (salsicha) e avaliar a viabilidade de substituição do eritorbato de sódio pela combinação desses compostos. A atividade antioxidante dessas misturas foi previamente avaliada por diferentes métodos *in vitro* e a proporção entre os compostos foi determinada através da metodologia de superfície de resposta (MSR). As misturas otimizadas sugeriram sinergismo entre os compostos ácido cafeico + ácido carnósico (47% + 53%) ou quercetina + rutina (67% + 33%). Essas misturas foram aplicadas em uma emulsão cárnea (salsicha) na concentração final de 500 e 800 mg/Kg. A amostra controle foi preparada com eritorbato de sódio (500mg/Kg), e os parâmetros de oxidação, pH, textura, cor, atividade de água, características sensoriais e microbiológicas dos produtos finais foram determinados durante o *shelf life* (45 dias). Em relação à estabilidade oxidativa, ambas misturas (lipossolúvel e hidrossolúvel) em ambas dosagens (500 e 800 mg/Kg), apresentaram menores concentrações de TBARS que a amostra formulada com o antioxidante artificial (eritorbato de sódio) durante o *shelf life*, porém, os compostos fenólicos não apresentaram eficiência na fixação da cor durante o processo de cura. Utilizando-se os resultados de análise sensorial como critério de viabilidade, pode-se afirmar que a amostra preparada com a mistura quercetina + rutina na proporção 500mg/Kg apresentou-se como melhor alternativa em substituir o eritorbato de sódio em formulações de salsichas tipo *hot dog*.

Palavras-chave: antioxidantes, fenólicos, eritorbato de sódio, MDA, análise sensorial.

1 INTRODUÇÃO

Salsichas são emulsões preparadas à base de carne, gordura animal, ervas, especiarias e outros aditivos, tais como emulsificantes e conservantes, amplamente consumida em vários países. Devido ao seu formato e forma de embalagem são classificadas como produtos embutidos. Do ponto de vista nutricional, é uma importante fonte de proteína de alto valor biológico (BERIAN et al., 2000). A fabricação de embutidos, de forma geral, representa um importante segmento da indústria de carnes. No Brasil, seu consumo substituiu outras fontes protéicas devido ao custo relativamente inferior, ao preço acessível de algumas marcas e à praticidade no preparo (MELO FILHO et al., 2004). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), através da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF), realizada no período de 2002 a 2003, a participação relativa de carnes no total de calorias da população brasileira representou 11.8%, sendo que os embutidos representaram 2.9% desse consumo.

Emulsões cárneas podem ser definidas como uma suspensão coloidal complexa formando um sistema bifásico que consiste em uma dispersão sólida (finas partículas de gordura) em um líquido (matriz ou solução aquosa de sais e proteínas), na qual o sólido não é naturalmente miscível (SCHUT, 1976; OLIVO, 2006). O alto teor de lipídeos em embutidos favorece a oxidação, levando a produção de compostos indesejáveis que alteram suas características sensoriais (ORDOÑEZ et al., 1999; ZANARDI et al., 2004). A oxidação em excesso reduz a aceitação por parte dos consumidores, degrada vitaminas, ácidos graxos essenciais e gera compostos tóxicos prejudiciais ao organismo humano (ZANARDI et al., 2004; ANSORENA & ASTIASARÁN, 2004).

Em matrizes alimentícias, nas quais os lipídeos estão dispersos na forma de gotas emulsionadas, ainda não existe consenso sobre o real mecanismo da oxidação lipídica. Segundo Frankel (2005), nesse tipo de sistema pode ocorrer a chamada "oxidação interfacial", ou seja, complexas interações entre os constituintes do sistema lipídico multifásico que podem ser favorecidas pela taxa de difusão do oxigênio e sua interação com ácidos graxos insaturados, metais e radicais dispersos nos compartimentos desse sistema coloidal.

Sendo assim, o uso habitual de aditivos sintéticos ou artificiais visa reduzir a oxidação, prevenir o desenvolvimento de microorganismos e aumentar o *shelf life*. No entanto, alguns antioxidantes sintéticos tradicionalmente utilizados pela indústria alimentícia, tais como o BHT (butildihidroxitolueno), o BHA (butildihidroxianisola), o TBHQ (terc-butilhidroquinona) o eritorbato de sódio e o EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético), são proibidos em países como Canadá e países da União Européia, devido ao potencial efeito carcinogênico decorrente do uso contínuo desses aditivos em alimentos (BOZKURT, 2006; SEBRANEK et al., 2005).

Atualmente, os consumidores têm buscado alimentos orgânicos, produtos com presença de ingredientes bioativos e com reduzido teor de aditivos no rótulo. Assim, diferentes tecnologias têm sido avaliadas em busca da condição ideal para conservação dos nutrientes e aumento do *shelf life* (VALENCIA et al., 2007; VALENCIA et al., 2008; ZANARDI et al., 2004; RUBIO et al., 2008; MARINOVA et al., 2009). Dessa forma, os antioxidantes naturais destacam-se como substitutos eficientes que podem ser aplicados com a finalidade de retardar ou inibir a oxidação, e, ainda, apresentar caráter funcional relevante. Alguns compostos naturais utilizados em alimentos podem, ainda, reduzir os riscos do desenvolvimento de doenças, tais como as doenças cardiovasculares e o câncer (BOZKURT, 2006; VALENCIA et al., 2008), quando consumidos em dose adequada como parte de uma alimentação saudável.

O extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*), por exemplo, é um dos antioxidantes naturais mais eficientes e mais utilizados pela indústria. Sua atividade deve-se à presença de diferentes diterpenos fenólicos em sua composição, tais como carnosol, ácido carnósico, rosmanol, entre outros que possuem ação *chain-breaking* (ARUOMA et al., 1992). Além do alecrim, os tocoferóis e os carotenóides, também, são compostos naturais que apresentam capacidade antioxidante, comportando-se como *chain-braking* ou como inibidores (*quenching*) de oxigênio singlete (FRANKEL, 2005).

Apesar da eficiência dos antioxidantes naturais, em inibir ou prevenir o processo de oxidação, ainda, não existe um consenso sobre a concentração ideal para sua aplicação em produtos alimentícios. Estudos citados em um artigo publicado por Georgetelis et al. (2007), recomendam o uso do extrato de alecrim

entre 200 e 1000 mg/Kg em diversos alimentos, sendo que 1000 mg/Kg apresentam a mesma eficiência que o BHA e o BHT (0.01 ppm) em salsichas pré-cozidas e congeladas. Valencia et al. (2008) observaram que 200 mg/Kg de catequinas de chá verde ou de extrato de antioxidantes do café verde apresentaram atividade antioxidante equivalente aos antioxidantes artificiais usualmente empregados em salsichas, tais como eritorbato de sódio, BHA e BHT.

A combinação de dois ou mais antioxidantes, em um mesmo sistema, pode resultar em sinergismo, pois cada composto pode atuar através de diferentes mecanismos (BECKER et al., 2007). O sinergismo pode se traduzir em vantagem econômica, uma vez que o mesmo resultado pode ser alcançado com concentrações menores que aquelas utilizadas com os compostos isolados. Extratos de plantas, por exemplo, podem conter mais de um composto antioxidante apresentando melhor atividade, quando comparado com uma substância isoladamente (ERKAN et al., 2008). Se a matriz alimentícia for uma emulsão, a diferença de solubilidade dos compostos e a natureza da interface podem levar ao sinergismo e à melhoria da atividade antioxidante (FRANKEL, 2005). Em emulsões, contendo metais como ferro, a oxidação pode ser retardada pela presença de agentes quelantes solúveis na fase aquosa, como o EDTA, que interage com o metal e previne o seu acesso ao substrato lipídico emulsificado (MC CLEMENTS et al., 2000). Em salsichas e maioneses a aplicação de uma mistura de compostos hidrofílicos e lipofílicos pode agir em sinergismo uma vez que o posicionamento desses compostos pode acontecer na interface ou perto da interface óleo-água (BECKER et al., 2007; ERKAN, 2008) da emulsão

Em um estudo anterior, diferentes compostos foram classificados de acordo com a atividade antioxidante através de cinco metodologias *in vitro* (CAPITANI et al., 2009a). Como base nos resultados obtidos, nesse estudo, foram selecionados três compostos naturais hidrossolúveis e três lipossolúveis. A atividade antioxidante dessas duas misturas foi modelada e otimizada através da metodologia de superfície de resposta (MSR), utilizando-se novamente ensaios *in vitro* para essa avaliação (Capitani et al., 2009b). Após análise dos resultados e a partir das proporções otimizadas *in vitro* para os três compostos hidrossolúveis e lipossolúveis, o objetivo do presente estudo foi aplicar essas proporções numa emulsão alimentícia (salsicha)

e avaliar a viabilidade de substituição do atual composto sintético utilizado como antioxidante (eritorbato de sódio) pela combinação desses compostos naturais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima e produção das salsichas

As salsichas foram elaboradas utilizando-se carnes frescas (quarto dianteiro moído, toucinho, pele de frango e carne de frango mecanicamente separada) obtidas a partir de indústrias locais. A proteína texturizada de soja (NL1000) foi obtida da empresa Exin Ind. Com. Ltd. (Massaranduba, SC). Os padrões de antioxidantes utilizados: ácido cafeico (C0625), rutina (R5143) e quercetina (Q0125) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) e o ácido carnósico (60%) foi adquirido da empresa Hunan Geneham Biomedical Technology Ltda (Changsha - China). O eritorbato de sódio foi, gentilmente, cedido pela empresa Kienast & Kratschmer Ltda (KRAKI, Santo André, SP).

A seleção dos antioxidantes utilizados em cada formulação baseou-se em um estudo anterior no qual foram elaborados dois tipos de misturas (CAPITANI et al., 2009b), sendo uma com antioxidantes hidrossolúveis (ácido cafeico, ácido carnósico e glutatona) e outra com lipossolúveis (quercetina, rutina e genisteína). A atividade antioxidante das misturas puras, binárias e ternárias foi avaliada por diferentes métodos *in vitro*. Em seguida, utilizou-se a metodologia de superfície de resposta (MSR) para otimização das proporções entre os compostos das misturas. O modelo otimizado sugeriu a utilização de uma mistura hidrossolúvel (H) contendo 47% de ácido cafeico e 53% de ácido carnósico ou de uma mistura lipossolúvel (L) com 67% de quercetina e 33% de rutina, as quais apresentaram sinergismo na atividade antioxidante.

A concentração de compostos, aplicada às formulações, foi baseada em dados de trabalhos recentes que recomendam a utilização de antioxidantes naturais em proporções que variam entre 200 a 1000 mg/Kg (SEBRANEK et al., 2005; GEORGENTELIS et al., 2007; VALENCIA et al., 2008), como substituto eficiente de

antioxidantes artificiais. Assim, neste estudo, optou-se por utilizar duas concentrações de cada mistura, ou seja, 500 mg/Kg (H500 e L500) e 800 mg/Kg (H800 e L800). Portanto, para alcançar a concentração mínima de antioxidantes hidrossolúveis (H500), mantendo a proporção de 47% de ácido cafeico e 53% de ácido carnósico, adicionou-se 237 mg/Kg de ácido cafeico em pó (99% de pureza) e 440 mg/Kg de ácido carnósico (60,7% de pureza). Já para a concentração de 800 mg/Kg (H800), adicionou-se 380 mg/Kg de ácido cafeico e 700 mg/Kg de ácido carnósico. Os dois compostos usados, para as misturas lipossolúveis, eram padrões com 99% de pureza. Dessa forma, para a concentração de 500 mg/Kg (L500) utilizou-se 340 mg/Kg de quercetina e 170 mg/Kg de rutina, seguindo o modelo otimizado, que indicou 67% de quercetina e 33% de rutina como sinergismo. Para a concentração máxima de 800 mg/Kg foram adicionados 540 mg/Kg de quercetina e 270 mg/Kg de rutina. Para o controle com eritorbato de sódio (CT), utilizou-se a concentração de 500 mg/Kg, usualmente empregada em embutidos.

Foram produzidos 7.0 Kg de cada amostra de acordo com a formulação sugerida pela equipe técnica da empresa Kienast & Kratschmer Ltda (KRAKI, Santo André, SP) (**Tabela 1**), e com base na legislação específica para salsichas tipo *hot dog* (BRASIL, 2000; BRASIL, 2007). De acordo com essas Instruções Normativas, as salsichas devem conter uma concentração mínima de 12% de proteína e máxima de 30% de gordura, além de um máximo de 2% de amido, máximo de 7% de carboidratos totais e um limite máximo de 60% de carne mecanicamente separada (CMS). A **Tabela 2** apresenta a composição centesimal das matérias-primas utilizadas para manufatura das salsichas, tomando-se a amostra CT como exemplo de cálculo. A CMS, a pele e o toucinho representaram 55% da composição das amostras e a concentração de malto-dextrina variou entre 1.0 g/100g e 0.97 g/100g de acordo com a adição de antioxidantes. Seguindo-se essa formulação, a concentração de carboidratos, proteínas e lipídeos foi mantida de acordo com a recomendação específica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2007).

Tabela 1. Formulação das amostras de salsichas (g/100g).

INGREDIENTES	CT ^a	H500 ^b	L500 ^b	H800 ^c	L800 ^c
CMS ^d de aves	45,000	45,000	45,000	45,000	45,000
Pele de frango	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
Dianteiro bovino limpo	28,000	28,000	28,000	28,000	28,000
Gordura suína (toucinho)	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
Gelo	5,664	5,664	5,664	5,664	5,664
Sal refinado	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Proteína texturizada de soja	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000
Fécula de mandioca	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
Nitrato de sódio	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030
Nitrito de sódio	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
Tripolifosfato de sódio	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250
Condimento salsicha S ^e	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Lactato de sódio	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
Eritorbato de Sódio	0,050	-	-	-	-
Cafeico	-	0,024	-	0,038	-
Carnósico	-	0,044	-	0,070	-
Quercetina	-	-	0,034	-	0,054
Rutina	-	-	0,017	-	0,027
Malto-Dextrina	1,000	1,000	1,000	0,970	0,970
TOTAL	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000

^aCT: controle elaborado com 500 mg/Kg de eritorbato de sódio

^bFormulações preparadas com a mistura hidrossolúvel e lipossolúvel na dosagem de 500 mg/Kg.

^cFormulações preparadas com a mistura hidrossolúvel e lipossolúvel na dosagem de 800 mg/Kg.

^dCMS: Carne mecanicamente separada

^eCondimento padrão para salsichas elaborado pela empresa Kienast & Kratschmer Ltda (KRAKI, Santo André, SP)

Tabela 2. Composição centesimal dos ingredientes utilizados na elaboração das salsichas e modelo de cálculo com base na formulação controle (CT)

Ingredientes		CMS ^a	Pele ^b	Carne ^c	Toucinho	Gelo	Sal	PTS ^d	Fécula ^e	Nitrito ^f	Nitrato ^f	Tripolifosfato ^f	Condimento ^g	Lactato ^f	ERY ^h	Malto-dextrina	TOTAL	Valores recomendados ⁱ	
Composição química dos ingredientes																			
Proteínas (g/100g)		10,25	2,28	22,00	2,88	0,00	0,00	24,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
Lípidos (g/100g)		21,21	51,56	4,70	68,47	0,00	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
Carboidratos (g/100g)		0,00	9,74	0,00	16,02	0,00	0,00	67,00	81,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	-	-	-
Composição química da amostra controle (CT)		45,00	5,00	28,00	5,00	5,66	1,00	4,00	2,00	0,03	0,01	0,25	1,00	2,00	0,05	1,00	100,00	-	-
Proteínas (g/100g)		4,61	0,11	6,16	0,14	0,00	0,00	0,96	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	≥ 12,00	
Lípidos (g/100g)		9,54	2,58	1,32	3,42	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	≤ 30,00	
Carboidratos (g/100g)		0,00	0,49	0,00	0,80	0,00	0,00	2,68	1,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	≤ 7,00	
Energia (Kcal/100g)		104,35	25,61	36,48	34,59	0,00	0,00	14,56	6,58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00	0,00	226,17	-
Umidade (g/100g)		30,69	1,80	20,10	0,63	0,00	0,00	0,36	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	53,94	-
Cinzas (g/100g)		0,48	0,02	0,31	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,82	-

^a CMS: Carne mecanicamente separada

^b Pele de frango

^c Carne: Quarto Dianteiro Moído

^d PTS: Proteína texturizada de soja

^e Fécula de mandioca

^f Nitrito de sódio (0.030 g/100g); Nitrato de sódio (0.006 g/100g); Tripolifosfato de sódio (0.250mg/100g) e Lactato de sódio (2.000 g/100g)

^g Condimento para salsichas elaborado pela empresa Kienast & Kratschmer Ltda (KRAKI, Santo André, SP)

^h Eritorbato de sódio utilizado para a elaboração da salsicha controle (CT) – 500 mg/Kg.

ⁱ Quantidade de ingredientes utilizada para preparo da salsicha Controle.

^j Valores recomendados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000; BRASIL, 2007).

As salsichas, desse experimento, foram elaboradas em um mesmo dia na planta piloto da empresa Kienast & Kratschmer Ltda. (Santo André, Brasil), de acordo com a formulação apresentada na **Tabela 1**. A concentração dos aditivos foi definida de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2007), que admite a concentração máxima de 0.015 g/100g de nitrito de sódio, 0.03 g/100g de nitrato de sódio (ambos como quantidade residual máxima expressa como nitrito de sódio) e 0.5 g/100g de tripolifosfato de sódio. A carne mecanicamente separada (CMS) foi cortada em cubos (aproximadamente 3 cm³) e moída em um processador de alimentos comercial (Mado New 603, Germany). Em seguida, a CMS foi homogeneizada juntamente com a carne bovina, o toucinho, a proteína texturizada de soja (PTS) e o gelo em um *cutter* ou emulgador (Kilia EX3000 RS, Germany) por 8-10 min, mantendo-se a temperatura abaixo de 12°C (**Figura 1A**). Na seqüência, os demais ingredientes foram adicionados lentamente e a mistura foi homogeneizada por aproximadamente 1 min. a 500 rpm (**Figura 1B e 1C**). A seguir, a emulsão foi manualmente transferida para um dosador (Handtmann VF50, Germany) e embutida em tripas de celulose com 22 mm diâmetro (**Figura 1D**). As salsichas foram cozidas (**Figura 1E**) usando uma estufa Bastra (modelo Bastramat 850, Germany) de acordo com a seguinte seqüência: seco por 30 min a 65°C (aberto), seco por 40 min a 75°C (fechado), e corrente úmida a 80°C com temperatura interna de 72-74°C. A temperatura foi monitorada por um termômetro colocado no centro da amostra. Depois de cozidas, as amostras foram, imediatamente, resfriadas em banho de gelo, retirada a tripa de celulose manualmente (**Figura 1F**), e embaladas à vácuo (Röscherwerke Röschermatic, Germany) em embalagens plásticas contendo 6 salsichas por embalagem. Em seguida, foi feita a pasteurização das amostras na mesma estufa de cocção (modelo Bastramat 850, Germany) a uma temperatura de 72°C por aproximadamente 25 minutos (**Figura 1G**), sendo levadas imediatamente ao banho de gelo para choque térmico. As embalagens foram armazenadas sob refrigeração (4°C) por 60 dias.

Para algumas das análises posteriores, as salsichas foram cozidas em microondas (Brastemp Maxi - BMS35BB, São Paulo, Brasil) à temperatura alta por 5 minutos, e mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos, antes do início dos procedimentos analíticos. A análise sensorial, a análise de textura e a determinação de TBARS por HPLC foram realizadas nas amostras cozidas. As demais análises foram realizadas com as amostras cruas. As medidas feitas nas salsichas cruas e/ou

cozidas foram realizadas imediatamente após a manufatura (T_0), depois de 15 (T_{15}), 30 (T_{30}) e 45 (T_{45}) de estocagem a 4°C.



Figura 1. Etapas do processamento da salsicha tipo *hot-dog*.

2.2 Análises químicas

Composição centesimal (amostras cruas)

A concentração de proteínas, lipídeos e cinzas foram determinadas a partir dos métodos descritos pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). O teor de proteína foi determinado pelo método micro-Kjeldahl, multiplicando-se o nitrogênio total pelo fator 6.25. A dosagem do teor lipídico nas salsichas foi realizada a partir do método Soxhlet utilizando-se éter etílico. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos como média \pm DP.

Valores de pH (amostras cruas)

O valor de pH foi determinado em 2g de amostra homogeneizadas em 20 mL de água destilada. A leitura foi realizada com um pHmetro (Quimis - Q400A, Diadema, Brasil) equipado com um indicador de temperatura e um eletrodo de vidro. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos como média \pm DP.

Atividade de água (amostras cruas)

A atividade de água (a_w) foi determinada utilizando-se o equipamento Novasina (Axair AG88C8, Switzerland). Esse equipamento contém 3 cápsulas conectadas a sensores de temperatura e de umidade que permitem avaliar a variação desses parâmetros na amostra. O equipamento é programado para manter a sua temperatura estável a 25°C de forma que a amostra apresentará uma variação na temperatura até atingir os 25°C. Portanto, o sensor indica qual o valor de atividade de água quando a temperatura da amostra atinge 25°C e sua umidade equilibra-se com a umidade da cápsula. Para isso, separou-se uma alíquota homogeneizada de aproximadamente 2.0 g de salsicha que foi colocada sobre cápsula ou sinos de cobre. Os sinos foram então selados com graxa formando-se vácuo no sistema. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média \pm DP.

2.3 Análise de cor (amostras cruas)

As análises de cor instrumental foram realizadas em um colorímetro Hunter Color Lab. (Hunterlab 12 Color Quest - CQXE/SAV/UV, Virginia, USA) por reflectância. Foi utilizado *software* Universal *software* 4.10 para calibração da iluminação D65 com ângulo de 10°, previamente calibrado com padrões de referência de preto e branco em uma abertura de 25,4 mm. Cada salsicha foi cortada ao meio no sentido longitudinal e a amostra de aproximadamente 1 cm de espessura e 5 cm de comprimento foi colocada dentro de uma cubeta de quartzo, sendo que a parte central foi colocada contra a abertura do equipamento. No colorímetro, a cor das amostras é representada por três dimensões L^* , a^* e b^* , correspondente ao sistema XYZ CIE lab system (**Figura 2**). O valor de L^* denota a medida de

luminosidade da amostra, sendo 100 para o branco total e zero para o preto total. As tonalidades entre vermelho e verde são determinadas pela letra a^* e a variação entre as tonalidades azul e amarelo, pela b^* (PRECISE, 1994). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média \pm DP.

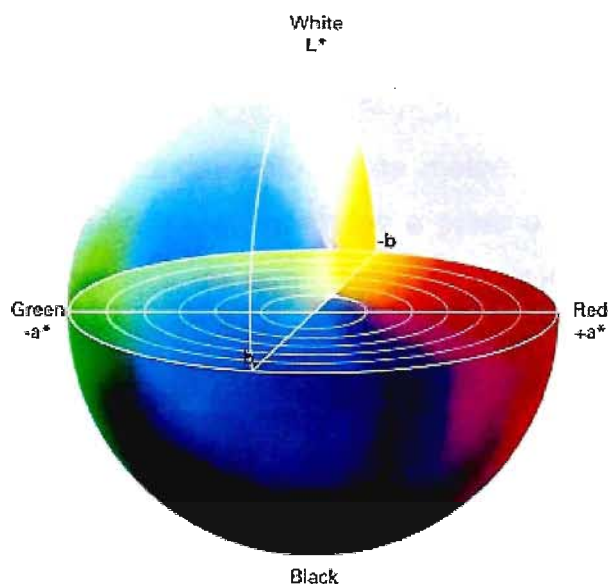


Figura 2. Representação de coordenadas do sistema L^* , a^* e b^* para avaliação de cor instrumental (PRECISE, 1994)

2.4 Análise de textura (amostras cruas e cozidas)

A análise de textura das salsichas cruas e cozidas foi realizada a partir da metodologia inicialmente descrita por Breene (1975), utilizando-se o equipamento TA-XT2i (Stable Microsystems, Surrey, UK) e o software Texture Expert v.1.20. As amostras foram cortadas em fatias horizontais com 2 cm de altura e 2 cm de espessura em cada uma das pontas. As amostras foram comprimidas com “probe” cilíndrico de 25 mm de diâmetro a uma velocidade de 1mm/s e nível de compressão de 50% desde a altura original até o prato. A dureza foi definida pelo pico de força durante o 1º ciclo de compressão e os resultados expressos em Newtons (N). As análises foram realizadas em temperatura ambiente, em quintuplicatas, e os resultados expressos como média \pm DP.

2.5 Parâmetros de oxidação lipídica (amostras cozidas)

Determinação da concentração de TBARS expressos como equivalentes de malondialdeído (MDA)

A concentração de TBARS nas salsichas foi monitorada durante 45 dias, utilizando-se separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para isso, utilizou-se a metodologia descrita por Bergamo et al. (1998) e Fenaille et al. (2001), com adaptações. O fundamento, deste método, baseia-se no princípio de que o MDA é uma das substâncias formadas a partir da degradação térmica dos hidroperóxidos durante a etapa de terminação da oxidação lipídica. A reação de 1 mol de MDA com 2 moles de TBA (ácido tiobarbitúrico), em meio ácido, forma um aduto (MDA-TBA) de cor rosa, que absorve em comprimento de onda de 532 nm. A quantidade de TBARS, formada na amostra, pode ser medida através de espectrofotômetro ou a partir de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo esse último mais sensível e preciso (BUCHNER et al., 2006).

Para determinar a concentração de MDA, nas amostras, pesou-se 2g de salsicha homogeneizada em tubo tipo "falcon" com tampa. Adicionou-se 3.75mL de água milli-Q e 0.25mL de solução de BHT 1% em etanol. O tubo foi fechado e homogeneizado em agitador de tubos por 2 minutos. A seguir, acrescentou-se 4.0 mL de uma solução de TCA 10% em água e o tubo foi fechado e, novamente, agitado por 2 minutos. Os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 10.000 g por 5 minutos (Hitach CF 15R – Tokyo, Japão). Uma alíquota do sobrenadante (300 µL) foi transferida para um *ependorf*, adicionando-se 700 µL de TBA 0.4% em tampão acetato de sódio 2M pH 3.2. Os *ependorfs* foram levados ao banho a 80°C por 35 minutos e, em seguida, resfriados e centrifugados novamente a 10.000 g por 5 min. O sobrenadante foi, então, transferido para um *vial* contendo um *insert* utilizando-se filtro Millex (Millipore - 0.45µm x 13mm).

A análise foi realizada em um cromatógrafo (Agilent Technologies 1200 series - Santa Clara, USA) utilizando-se detector DAD a 532 nm e coluna analítica Phenomenex Reverse-phase C18 (250 mm x 4.6 mm; 5 µm, Phenomenex, Torrance, USA) com pré-coluna LC8-D8 (Phenomenex AJ0-1287,

Torrance, USA). O auto-amostrador foi programado para injetar um volume de 40 μ L. A taxa de fluxo da bomba foi 1.0 mL/min com fase móvel constituída de 60% tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6.0 e 40 % metanol. Após a corrida das amostras a coluna foi lavada com acetonitrila, metanol e água. As amostras foram mantidas a 4°C e o pico de MDA foi identificado em, aproximadamente, 8 minutos. Em todas as corridas, utilizou-se como controle interno solução de MDA 0.25 μ g/mL (Fluka 63287).

Para a quantificação de MDA nas amostras foi feita uma curva de calibração com o padrão MDA (Fluka 63287) em concentrações de 0 a 1.25 μ g/mL diluído em água milli-Q. A partir da equação, gerada por essa curva, foi realizado o cálculo da concentração de TBARS nas amostras, e os resultados foram expressos em mg equivalentes de MDA/Kg de amostra. A equação utilizada para cálculo da concentração de MDA foi a seguinte: *Concentração de MDA (μ g/mL) = 0.0226 x área do pico* ($r = 0.995$, $p < 0.01$). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média \pm DP.

Análise sensorial (amostras cozidas)

Os parâmetros de oxidação também foram analisados a partir de análise sensorial com painel treinado. Inicialmente, foi feita seleção dos provadores aplicando-se o teste para reconhecimento de gostos básicos (salgado, doce, amargo e ácido) com 40 candidatos, sendo 30 selecionados para a etapa posterior. Em seguida foi feito um treinamento com os 30 voluntários selecionados e quatro atributos foram identificados e discutidos (aparência, odor, sabor e textura), utilizando-se o Teste de Diferença Escalar do Controle (DEC). Nesse teste, os provadores foram treinados para uso de uma escala com 9 pontos, na qual o valor 1 significava que o atributo avaliado era extremamente similar à amostra controle, enquanto o valor 9 significava que o atributo analisado era extremamente diferente do controle, e, para isso, utilizou-se salsicha comercial como controle. As salsichas (\pm 50 g) foram cozidas por 5 minutos em 500 mL de água contendo diferentes concentrações de sulfato ferroso (0 a 0.1%). A **Figura 3** apresenta os valores quantificados de TBARS, expressos como equivalentes de MDA (mg MDA/Kg amostra) nas salsichas cozidas em solução de sulfato ferroso e utilizadas no

treinamento. Os valores de MDA (mg/Kg) foram determinados utilizando-se separação pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme metodologia previamente descrita.

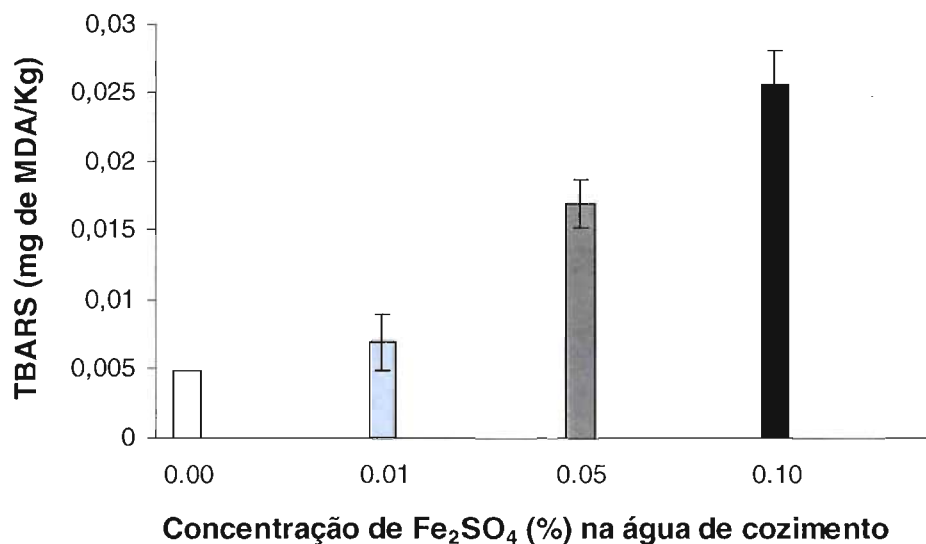


Figura 3. Concentração de TBARS expressos em MDA (mg/Kg amostra) de salsichas cozidas em solução de sulfato ferroso (0 a 0.1%).

Após explicação prévia, sobre os parâmetros sensoriais que deveriam ser analisados, os voluntários participaram do teste em cabines individualizadas, a fim de avaliar a capacidade de cada provador em diferenciar as amostras preparadas especificamente para o teste. Os provadores receberam três amostras (salsicha padrão, salsicha cozida com 0.01% e salsicha com 0.10% de Fe₂SO₄) sendo cada amostra avaliada duas vezes. A capacidade de diferenciação e a repetibilidade, dos resultados de cada voluntário, foi analisada por ANOVA. A **Tabela 3** apresenta a classificação dos provadores. Utilizou-se o valor de probabilidade p referente à amostra como capacidade de diferenciação. Portanto, quanto menor o valor de p (amostra) maior a capacidade de diferenciação pelo provador. O valor de p repetição não significativo ($p > 0.05$) indica maior repetibilidade dos resultados pelo mesmo provador. O critério adotado para classificação foi a ordenação crescente pelos valores de p amostra ($p < 0.05$) seguido dos valores decrescentes de p para repetibilidade. Seguindo essa classificação vinte provadores foram recrutados para as análises sensoriais realizadas neste estudo. As análises sensoriais foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Alimentos e

Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo durante os tempos zero, 15, 30 e 45 dias. As amostras foram codificadas com três dígitos e apresentadas aos provadores em blocos aleatórios (RDB), nos quais a ordem de apresentação foi definida por sorteio. Cada um dos dez provadores avaliou um bloco por sessão. Utilizou-se luz vermelha visando mascarar o efeito expressivo da coloração das amostras na diferenciação com o controle.

Tabela 3. Valores de probabilidade (p) obtidos por ANOVA para amostra e repetibilidade nas análises sensoriais após treinamento.

Resultado geral dos provadores			Provadores selecionados		
Provador	p (repetição)	p (amostra)	Provador	p (repetição)	p (amostra)
1	0,4226	0,1250	10	0,4226	0,0063
2	0,6667	0,0227	23	0,4226	0,0091
3	0,6667	0,0250	14	0,0572	0,0122
4	0,5799	0,1522	15	0,0572	0,0122
5	0,6667	0,5000	22	0,1835	0,0156
6	0,1296	0,0500	2	0,6667	0,0227
7	0,0634	0,2692	3	0,6667	0,0250
8	0,5471	0,3875	21	0,6667	0,0263
9	0,8259	0,1600	26	0,2254	0,0319
10	0,4226	0,0063	6	0,1296	0,0500
11	0,2254	0,0750	27	1,0000	0,0750
12	0,4226	0,1250	11	0,2254	0,0750
13	0,8020	0,5568	19	0,7418	0,0814
14	0,0572	0,0122	32	0,1567	0,1048
15	0,0572	0,0122	17	0,6667	0,1250
16	0,2254	0,2500	12	0,4226	0,1250
17	0,6667	0,1250	1	0,4226	0,1250
18	0,8020	0,2500	4	0,5799	0,1522
19	0,7418	0,0814	29	0,4778	0,1579
20	0,8259	0,6957	25	0,4778	0,1579
21	0,6667	0,0263	9	0,8259	0,1600
22	0,1835	0,0156	28	0,3828	0,2321
23	0,4226	0,0091	18	0,8020	0,2500
24	0,6667	0,9000	31	0,6220	0,2500
25	0,4778	0,1579	30	0,3206	0,2500
26	0,2254	0,0319	16	0,2254	0,2500
27	1,0000	0,0750	7	0,0634	0,2692
28	0,3828	0,2321	8	0,5471	0,3875
29	0,4778	0,1579	5	0,6667	0,5000
30	0,3206	0,2500	13	0,8020	0,5568

2.6 Análise microbiológica (amostras cruas)

As amostras cruas foram submetidas à análise microbiológica nos tempos T_0 , T_{15} , T_{45} e T_{60} dias. Foram analisados os valores de coliformes termo-tolerantes ou coliformes a 45°C , *Staphylococcus aureus*, Clostrídios sulfito-redutores, *Salmonella ssp.* e bactérias lácticas segundo a metodologia descrita por Downes & Ito (2001). A seguir, estão descritos os métodos usados para cada tipo de análise microbiológica:

Determinação de coliformes termo tolerantes

Para determinação da concentração de coliformes a 45°C , as amostras foram pesadas e diluídas e em seguida, 1 mL da solução foi transferido para 3 tubos contendo lauril sulfato triptose (LST), homogeneizada e incubada a 35°C por 48h. Em seguida, foram separados os tubos que apresentavam turvação do meio e gás no interior do tubo de Durham. O conteúdo dos tubos foi transferido com auxílio de uma alça de metal para outro tubo contendo caldo bile lactose verde brilhante (BLVB) e incubado novamente a 35°C por 48h. Os tubos turvos e com gás no interior foram selecionados, e calculou-se o “número mais provável de microorganismos termo-tolerantes” por grama de alimento. Os resultados foram expressos em número UFC/mL de microorganismos termo-tolerantes totais.

Pesquisa de *Salmonella ssp.*

Inicialmente, homogeneizou-se 25 g de salsicha com 225 mL de solução salina, incubando a $35\text{-}37^\circ\text{C}$ por 24 horas. Transferiu-se 1 mL para um tubo contendo 10 mL de caldo tetracionado e 0.1 mL para um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis. O primeiro foi incubado a 35°C , e o segundo a 42°C , por 24 horas. Em seguida, cada cultura do enriquecimento foi semeada com alça em placas de ágar sulfito de bismuto (SB), ágar Hektoen-enteric (HE) e ágar Rambach (RAM), de modo a obter colônias isoladas. As placas foram incubadas a $35\text{-}37^\circ\text{C}$ por 24 horas. Não houve identificação de colônias suspeitas e a análise foi então encerrada.

Enumeração de clostrídios sulfito-redutores

As amostras foram homogeneizadas, diluídas em série e plaqueadas, ou seja, transferiu-se 1 mL de cada diluição para placas de Petri esterilizadas. Adicionou-se cerca de 15 mL de ágar TSC, resfriado a 50°C, homogeneizando suavemente. Após solidificação do ágar, foi adicionada nova camada (5 mL) de ágar TSC, cobrindo toda a superfície (*over-ágar*). Após a solidificação da sobrecamada, as placas foram incubadas sem inverter, em ambiente de anaerobiose, durante 24 horas a 46°C. Seguido o tempo de incubação, foram selecionadas e contadas as colônias negras. Os resultados foram expressos em UFC/grama de alimento.

Enumeração de *Staphylococcus aureus*

Após homogeneização e diluição seriada das amostras, transferiu-se 0.1 mL de cada diluição do alimento para a superfície do meio Baird-Parker, espalhando-se com a alça de Drigalski. Após completa secagem da superfície do ágar, as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 48 horas. Decorrido o tempo de incubação, não houve identificação de colônias suspeitas e o método foi interrompido. Os resultados foram expressos em UFC/grama de alimento.

Enumeração de bactérias lácticas

Para a enumeração de bactérias lácticas, amostras de 25 g de salsicha foram acondicionadas em sacos plásticos para amostragem estéreis (Whirl-Pak 1650 mL, NASCO, USA) e adicionadas de 225 mL de solução salina estéril 0.85%. Após homogeneização em *stomacher* (Seward Medical, Inglaterra), as amostras foram submetidas à diluição decimal seriada em solução salina 0.85% e semeadas por profundidade em *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) ágar (Oxoid Ltda, Basingstoke, Inglaterra) e incubadas a 30°C por 48h sob condições de microaerofilia. Após incubação, foram selecionadas as placas contendo entre 25-250 colônias, procedendo-se a enumeração das mesmas. As contagens foram expressas em UFC/g de produto.

3 RESULTADOS

3.1 Composição centesimal

A **Tabela 4** apresenta os valores de umidade, proteínas, lipídeos, carboidratos, cinzas e energia das matérias-primas utilizadas para elaboração das salsichas. De acordo com o Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MA - BRASIL, 2007), a carne mecanicamente separada (CMS) deve apresentar no mínimo 12% de proteína e no máximo 30% de gordura. Observou-se que a CMS utilizada neste estudo apresenta uma concentração de proteínas abaixo do mínimo recomendado pelo MA. A concentração de lipídeos, também, encontra-se abaixo do valor máximo permitido, sugerindo que esta CMS deve apresentar um valor de umidade superior aos padrões recomendados pelo MA.

Tabela 4. Teor de cinzas, proteínas e lipídeos (g/100g) das matérias-primas utilizadas para produção das salsichas (média \pm DP)

Amostra	Cinzas	Proteínas	Lipídeos
Carne ^a	1.1 \pm 0.0	21.9 \pm 2.4	4.7 \pm 1.5
CMS ^b	1.1 \pm 0.2	10.2 \pm 0.1	21.2 \pm 0.7
Pele ^c	0.37 \pm 0.1	2.3 \pm 0.7	51.6 \pm 2.2
Toucinho	0.13 \pm 0.0	2.9 \pm 0.8	68.5 \pm 2.1

^aQuarto dianteiro bovino moído

^bCMS: Carne mecanicamente separada

^cPele de frango

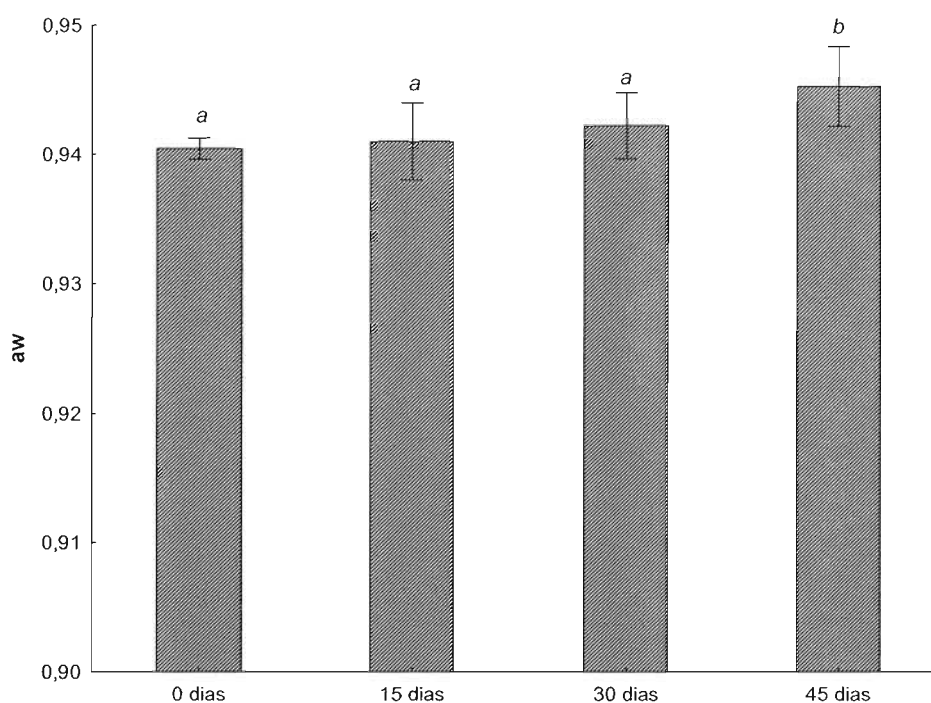
Na **Tabela 5**, estão descritos os valores de composição centesimal das amostras de salsichas elaboradas com as misturas de antioxidantes naturais, ácido cafeico + ácido carnósico (H500 e H800), quercetina + rutina (L500 e L800) e o controle (CT) elaborado com eritorbato de sódio (500 mg/Kg). Todas as amostras atenderam as exigências mínimas de 12% de proteínas e máximas de 30% de lipídeos (BRASIL, 2000; BRASIL, 2007). A concentração de proteínas, dessas amostras, foi semelhante aos valores descritos (12.6%) em embalagens de salsicha tipo *hot dog* comerciais.

Tabela 5. Teor de cinzas, proteínas e lipídeos (g/100g) das amostras de salsichas (média \pm DP)

Amostra	Cinzas	Proteínas	Lipídeos
CT	3.4 \pm 0.0	13.8 \pm 0.4	14.4 \pm 0.6
H500	3.3 \pm 0.0	13.1 \pm 0.3	14.0 \pm 0.9
L500	3.3 \pm 0.0	12.9 \pm 0.2	13.8 \pm 0.4
H800	3.4 \pm 0.0	13.4 \pm 0.3	14.1 \pm 0.3
L800	3.3 \pm 0.0	12.8 \pm 0.4	14.4 \pm 0.4

3.2 Atividade de água (aw)

Diferenças estatísticas foram observadas entre o tempo ($p < 0.01$) e a interação tempo vs. amostra ($p < 0.01$), observando-se aumento significativo ($p < 0.01$) da aw das amostras a partir do 30º dia (**Figura 4**). Os resultados de aw não apresentaram diferença significativa ($p = 0.37$) entre as amostras, sendo que a média dos resultados foi de 0.94 ± 0.00 .

**Figura 4.** Valores médios de atividade de água (aw) das salsichas durante 45 dias ($n=3$). Barras seguidas de letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os intervalos de tempo ($p > 0.01$)

De acordo com Rubio et al. (2008), a média de valores de a_w de salsichas tipo *salsichón* foi de 0.86 durante 210 dias armazenadas a 6°C. Figueiredo et al. (2001) observaram que durante 28 dias de armazenamento, salsichas do tipo *viena* mantiveram o valor de atividade de água constante, sendo este em média 0.97. De acordo com Bobbio & Bobbio (1995), a faixa de atividade de água de salsichas varia normalmente entre 0.95 a 1.00 e a manutenção desses valores durante o *shelf life* indica que o produto foi mantido em condições adequadas de armazenamento.

3.3 Valores de pH

Os resultados de pH (Figura 5) indicaram diferença significativa entre as amostras ($p < 0.01$) e entre o tempo ($p < 0.01$). A interação tempo vs. amostra não diferiu significativamente para esse parâmetro ($p = 0.64$). A amostra H800 apresentou menores valores de pH, quando comparada às demais salsichas. Observou-se variação dos valores de pH entre os tempos zero, 15 e 30 dias ($p < 0.01$), porém, a partir do 30º dia não houve variação significativa ($p > 0.01$) do pH.

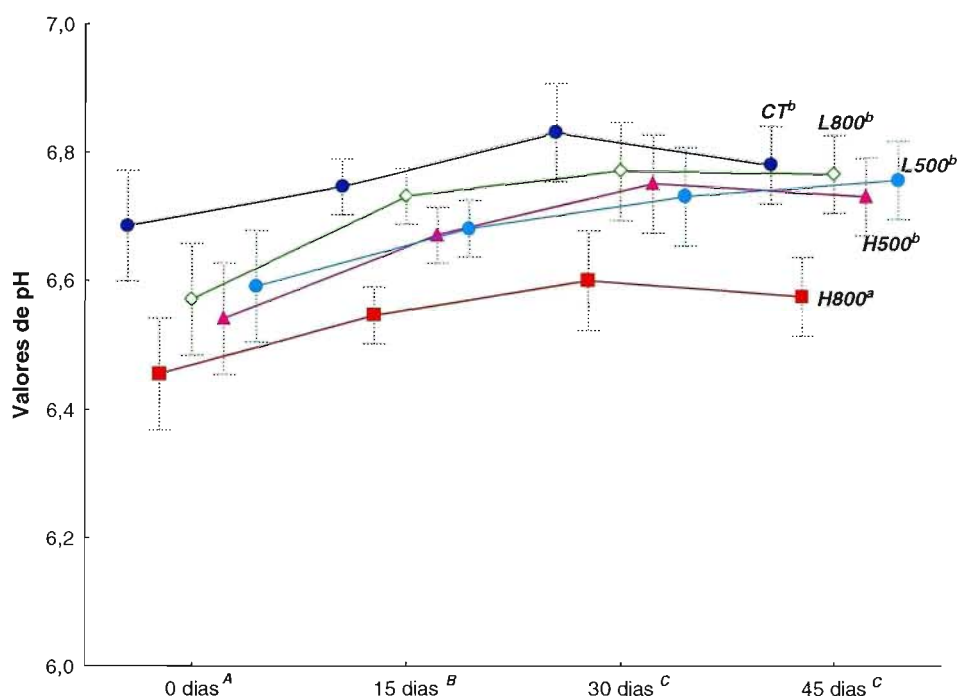


Figura 5. Valores de pH das amostras de salsichas elaboradas com eritorbato de sódio (CT), com antioxidantes hidrossolúveis (H500 e H800) e com antioxidantes lipossolúveis (L500 e L800) armazenadas a 4°C durante 45 dias (n=2). Valores de probabilidade determinados através da ANOVA para MR: amostras ($p < 0.01$), tempo ($p < 0.01$) e interação amostra vs. tempo ($p = 0.64$). Amostras seguidas da mesma letra (minúscula) e tempos seguidos da mesma letra (maiúscula) não apresentam diferença significativa ($p > 0.01$) entre as médias de todos os resultados nesse período (45 dias).

3.4 Análise microbiológica

A partir da análise microbiológica das salsichas foi possível certificar-se que as condições de fabricação e armazenamento foram adequadas, pois durante o *shelf life* não foi detectada presença significativa de coliformes termo tolerantes, de *Staphylococcus aureus*, de Clostrídeos e de *Salmonella ssp.* De acordo com a Resolução nº12 de 02 de janeiro de 2001 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA), produtos embutidos, como salsichas, apresentam condições sanitárias satisfatórias quando os resultados encontram-se abaixo ou igual aos estabelecidos nas análises de amostra indicativa, ou seja, os valores de coliformes termo tolerantes ou coliformes a 45°/g devem ser $\leq 10^3$, *Staphylococcus aureus* $\leq 3 \times 10^3$, Clostrídeos $\leq 5 \times 10^2$ e a *Salmonella ssp.* deve estar ausente. Dessa forma, as amostras deste estudo estavam de acordo as exigências em relação à segurança microbiológica uma vez que o número de coliformes termo tolerantes permaneceu abaixo de 3.0 NMP/g, a contagem de *Staphylococcus aureus* foi menor que 100 UFC/g, o número de unidades formadoras de colônia de Clostrídeos permaneceu menor que 10 UFC/g e não foi detectada presença de *Salmonella ssp.* em nenhuma das amostras durante o *shelf life*.

Ao analisar o número de bactérias lácticas, observou-se a presença de unidades formadoras de colônia (UFC/g) (**Tabela 6**), a partir do 15º dia de armazenamento.

Tabela 6. Contagem de bactérias lácticas, expressa em UFC/g nas diferentes amostras de salsichas armazenadas a 4°C durante 60 dias (n=2)

Bactérias lácticas (UFC/g)					
Tempo (dias)	Amostras				
	CT	H500	H800	L500	L800
0	<10	<10	<10	<10	<10
15	<10	<10	<10	<10	<10
30	7.4×10^4	3.7×10^4	9.5×10^3	2.4×10^7	9.2×10^6
45	6.0×10^6	3.8×10^5	3.7×10^4	3.8×10^5	2.5×10^4

3.5 Análise de cor

A **Figura 6** apresenta os valores de luminosidade das salsichas durante 45 dias, expressos como valor de L^* . Diferenças significativas foram observadas entre os tempos ($p < 0.05$), as amostras ($p < 0.01$) e a interação tempo vs. amostra para o valor L^* ($p < 0.01$). Embora variações no valor de L^* tenham sido observadas, durante o *shelf life*, o valor médio inicial ($L^* = 47.59 \pm 2.16$) não diferiu do valor final ($L^* = 47.53 \pm 2.03$) determinados após 45 dias de armazenamento a 4°C. Verificou-se que a CT ($L^* = 49.58 \pm 1.51$) foi a amostra mais clara durante todo o período de *shelf life*.

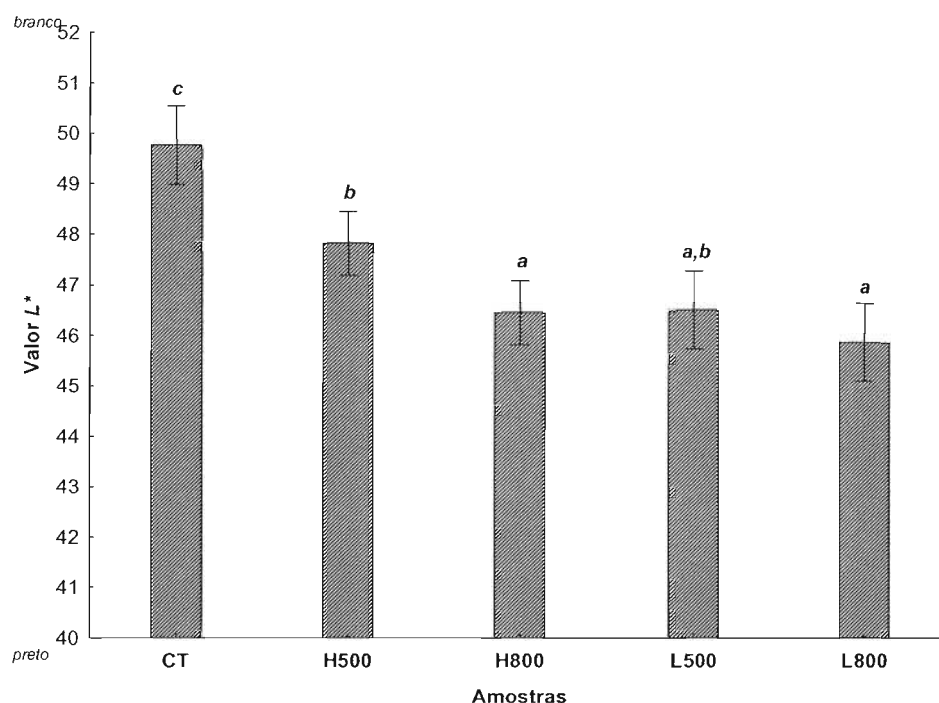


Figura 6. Valores médios de L^* das amostras nos diferentes intervalos de tempo ($n=3$). Valores de probabilidade determinados através da ANOVA MR: amostra ($p < 0.01$) e interação tempo vs. amostra ($p < 0.01$). Barras seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa ($p > 0.01$).

O valor de a^* , que define a variação de tonalidade entre vermelho e verde (**Figura 7**), diferiu entre as amostras ($p < 0.01$), durante o armazenamento ($p < 0.05$), e na interação tempo vs. Amostra ($p < 0.01$). Apesar de haver variação do valor a^* das amostras, durante o armazenamento (45 dias), esses resultados não diferiram dos valores iniciais ($p > 0.01$). Pode-se observar que os maiores valores de a^* (**Figura 7**) foram obtidos com a CT (10.07 ± 0.56), enquanto a amostra H800 apresentou os

menores valores (6.38 ± 0.91). Menor valor de a^* na amostra H800 pode ser atribuído a sua cor esverdeada obtida com a adição da mistura de ácido cafeico e ácido carnósico, já que este último apresentava em sua composição 40% de outros compostos extraídos do alecrim.

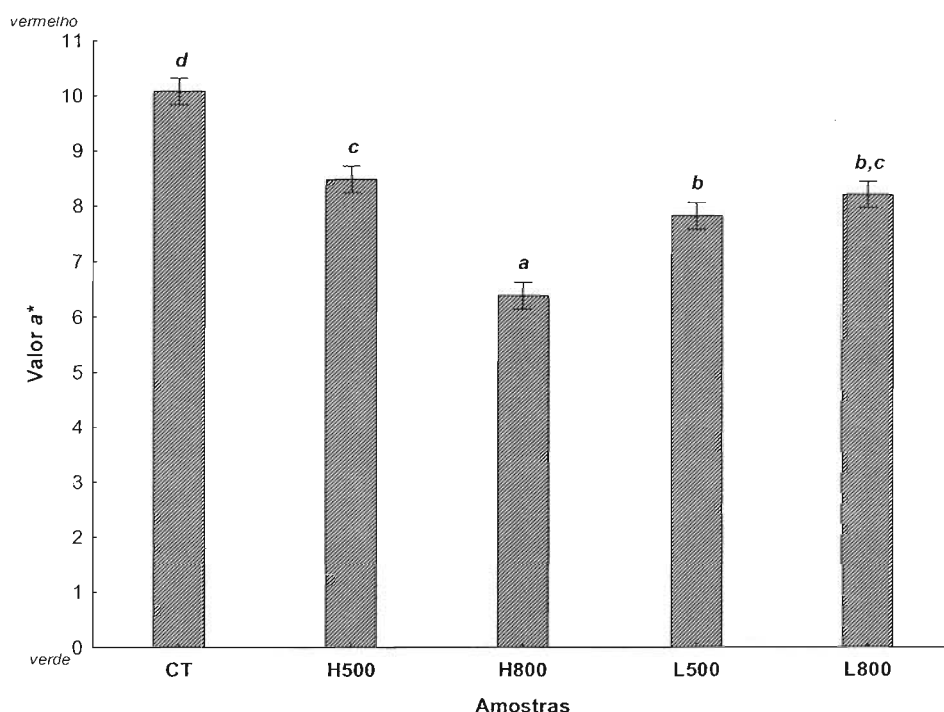
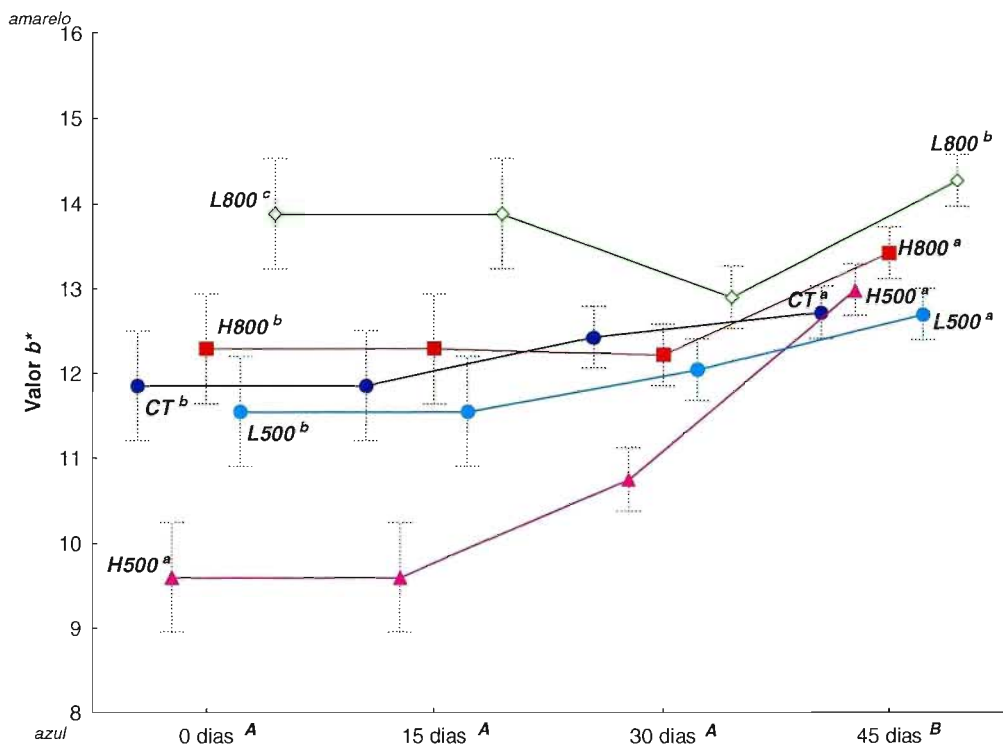


Figura 7. Valores médios de a^* das amostras nos diferentes intervalos de tempo ($n=3$). Valores de probabilidade determinados através da ANOVA MR: amostra ($p<0.01$) e interação tempo vs. amostra ($p<0.01$). Barras seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa ($p>0.01$).

Em relação a variação entre as tonalidades amarelo e azul, foram observadas diferenças significativas entre as amostras ($p<0.01$), entre o tempo ($p<0.01$) e para a interação tempo vs. amostra ($p<0.01$) para o valor de b^* (**Figura 8**). As amostras apresentaram aumento significativo ($p<0.01$) da tonalidade amarela a partir do 30º dia de armazenamento e os maiores valores de b^* foram obtidos com a amostra L800 (13.76 ± 0.58), a partir de 45 dias, o que pode ser atribuído à coloração naturalmente amarela da quercetina e da rutina utilizadas nessa mistura.



Figuras 8. Valores b^* das salsichas controle (CT), com antioxidantes hidrossolúveis (H500 e H800) e lipossolúveis (L500 e L800) armazenadas a 4°C durante 45 dias ($n=3$). Valores de probabilidade determinados através da ANOVA MR: amostra ($p<0.01$), tempo ($p<0.01$) e interação tempo vs. amostra ($p<0.01$). Amostras seguidas da mesma letra (minúscula) e tempos seguidos da mesma letra (maiúscula) não apresentam diferença significativa ($p>0.01$).

3.6 Parâmetros de textura

Observaram-se diferenças significativas na dureza das amostras ($p<0.01$) de salsichas cruas (**Figura 9**) e cozidas (**Figura 10**), bem como no tempo de armazenamento ($p<0.01$) e na interação tempo vs. amostra ($p<0.01$). Pode-se verificar que, inicialmente, nas amostras cruas (T_0), a H800 era mais dura que as demais ($p<0.01$), e aos 45 dias as amostras CT e H800 foram as que apresentaram valores significativamente maiores de dureza ($78.41 \text{ N} \pm 6.23$ e $79.41 \text{ N} \pm 5.42$, respectivamente), seguidas da amostra L800 ($66.30 \text{ N} \pm 4.38$).

Observou-se a mesma tendência das amostras cruas com as amostras cozidas, ou seja, a amostra H800 apresentou maior dureza no T_0 ($75.80 \text{ N} \pm 3.37$) e aos 45 dias as amostras CT e H800 apresentaram maior dureza ($84.62 \text{ N} \pm 3.05$ e $85.04 \text{ N} \pm 5.47$, respectivamente), seguindo da amostra H500 ($75.66 \text{ N} \pm 4.75$) (**Figura 10**).

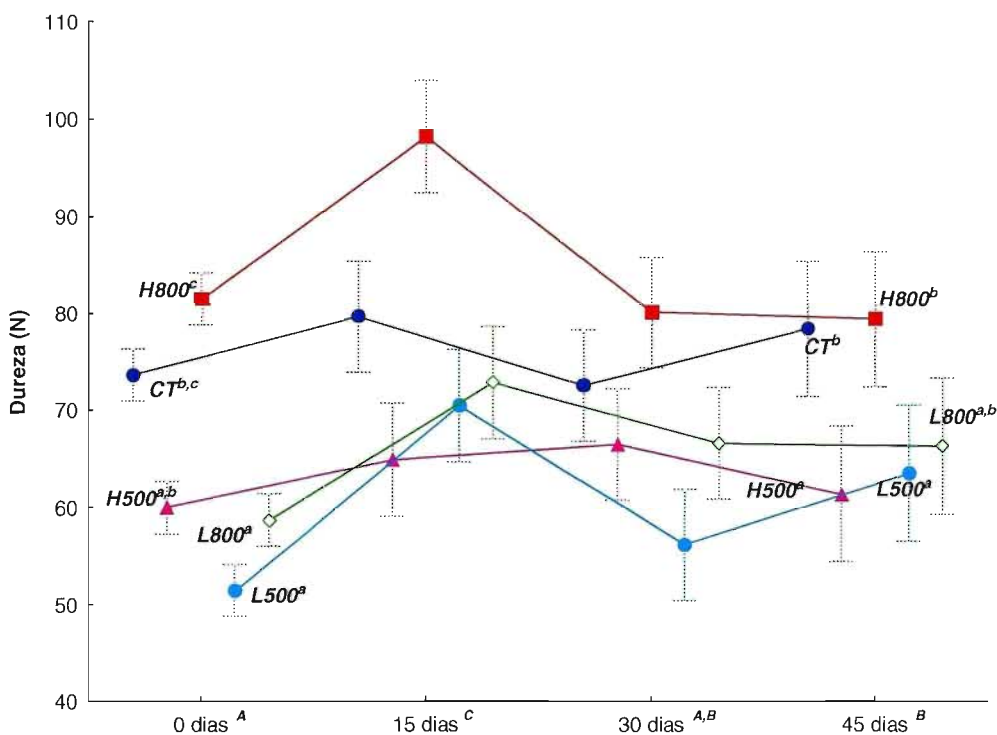


Figura 9. Valores de dureza (N) das salsichas cruas elaboradas com eritorbato de sódio (CT), com antioxidantes hidrossolúveis (H500 e H800) e lipossolúveis (L500 e L800) armazenadas a 4°C por 45 dias (n=5). Valores de probabilidade determinados através da ANOVA MR: amostra (p<0.01), tempo (p<0.01) e interação tempo vs. amostra (p<0.01). Amostras seguidas da mesma letra (minúscula) e tempos seguidos da mesma letra (maiúscula) não apresentam diferença significativa (p>0.01).

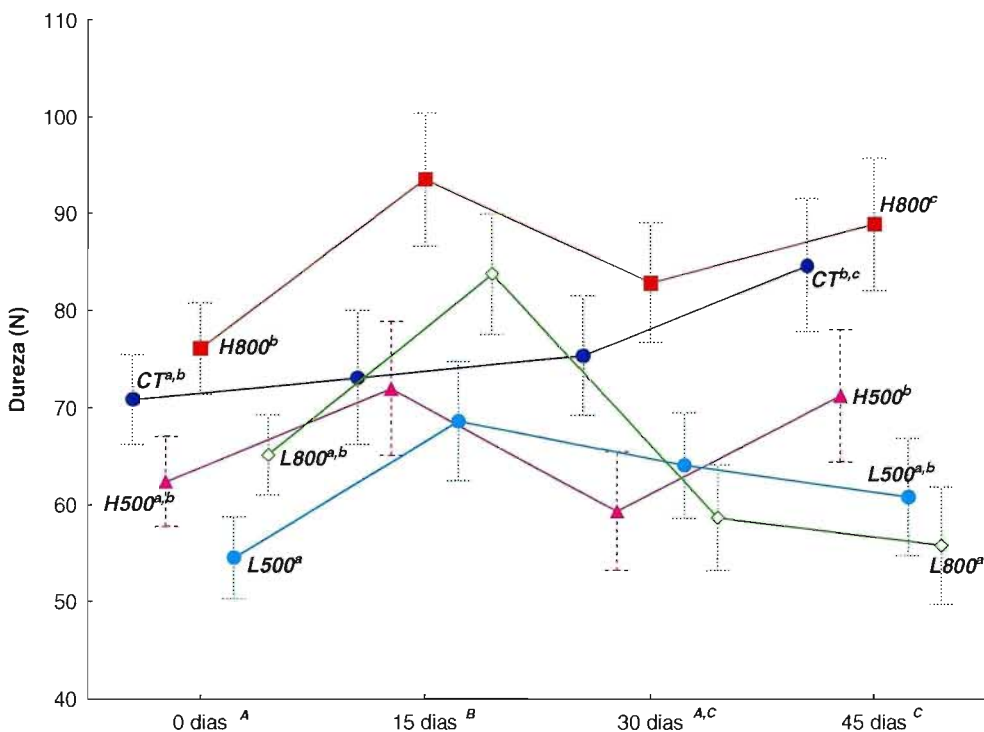


Figura 10. Valores de dureza (N) das salsichas cozidas elaboradas com eritorbato de sódio (CT), com antioxidantes hidrossolúveis (H500 e H800) e lipossolúveis (L500 e L800) armazenadas a 4°C por 45 dias (n=5). Valores de probabilidade determinados através da ANOVA MR: amostra (p<0.01), tempo (p<0.01) e interação tempo vs. amostra (p<0.01). Amostras seguidas da mesma letra (minúscula) e tempos seguidos da mesma letra (maiúscula) não apresentam diferença significativa (p>0.01).

3.7 Análise sensorial

Os resultados de análise sensorial mostraram diferença significativa apenas para a amostra ($p < 0.01$), sendo que o tempo ($p = 0.24$) e a interação tempo vs. amostra ($p = 0.29$) não diferiram significativamente. Verificou-se que as amostras H500 e H800 diferiram do controle e os valores próximos a 9.0 indicam que a amostra H800 foi a que mais diferiu em relação aos atributos sensoriais (cor, odor, textura e sabor) quando comparada ao controle (**Figura 11**). Esses resultados podem ser associados ao uso do extrato de alecrim em pó (*Rosmarinus officinalis*) como fonte de ácido carnósico, uma vez que esse composto representava 60% do produto e sua coloração era nitidamente escura e esverdeada, com odor característico de alecrim.

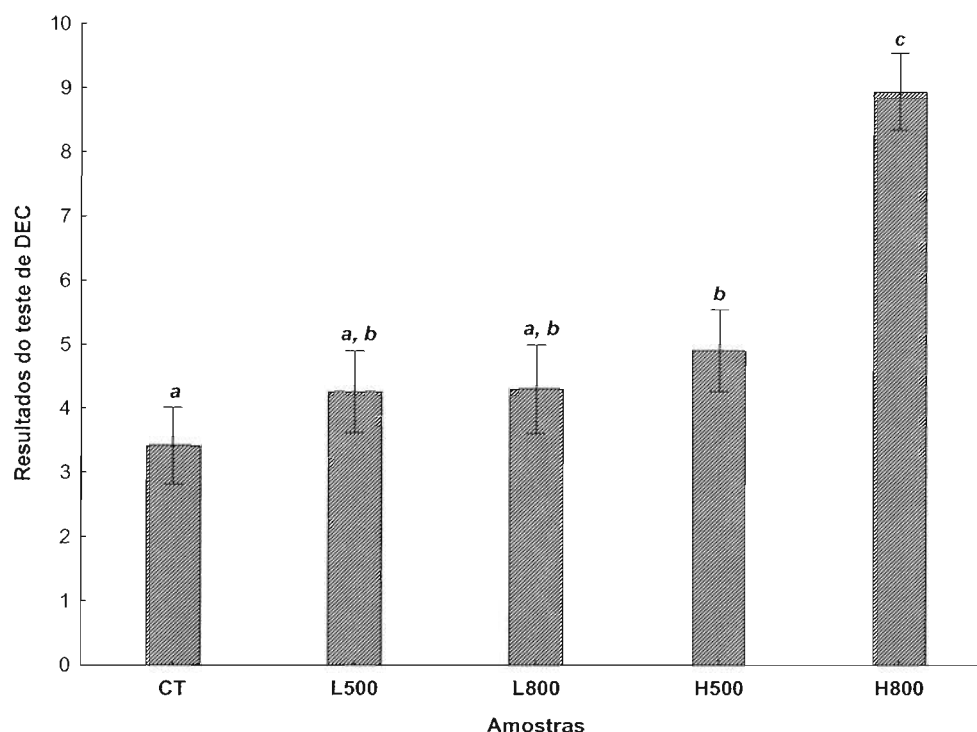


Figura 11. Valores médios dos resultados da análise sensorial a partir do teste de Diferença Escalar do Controle (DEC) das salsichas com antioxidantes hidrossolúveis (H500 e H800) e lipossolúveis (L500 e L800) vs. controle (CT) ($n=20$, média \pm DP). Valores de probabilidade determinados através da ANOVA MR: amostra ($p < 0.01$). Barras seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa ($p > 0.01$)

3.8 Resultados de TBARS expressos em mg MDA/Kg de amostra

Ao analisar os resultados de TBARS, foram observadas diferenças significativas entre as amostras ($p < 0.01$), o tempo ($p < 0.01$) e interação tempo vs. amostra ($p < 0.01$) (Figura 12). Observou-se que a amostra CT obteve maior valor de TBARS, em 15 dias de armazenamento (média de 0.45 ± 0.01 mg MDA/Kg amostra), havendo decaimento desses resultados, após 45 dias (média de 0.43 ± 0.00 mg MDA/Kg amostra \pm DP). Já as amostras L500, H500 e H800 foram as que mostraram menor formação de MDA, em 45 dias de armazenamento, e após cozimento (média de 0.28 ± 0.01 mg MDA/Kg amostra).

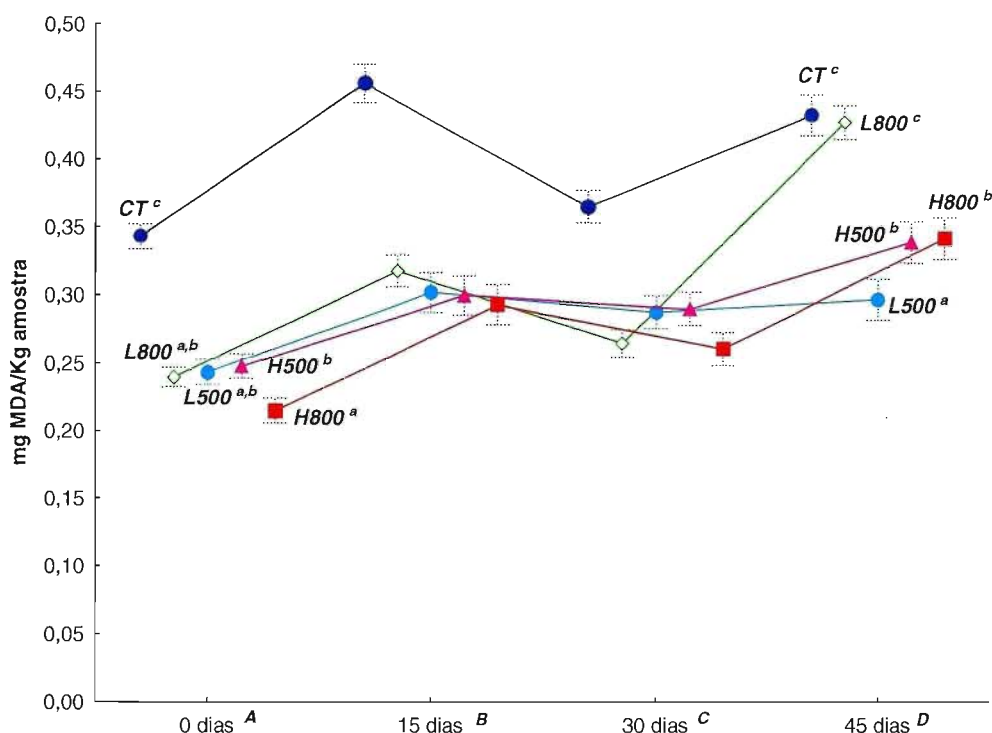


Figura 12. Variação da concentração de TBARS (expressa como mg MDA/Kg amostra) nas salsichas cozidas elaboradas com eritorbato de sódio (CT), com antioxidantes hidrossolúveis (H500 e H800) e lipossolúveis (L500 e L800) armazenadas a 4°C durante 45 dias ($n=3$). Valores de probabilidade determinados através da ANOVA MR: amostra ($p < 0.01$), tempo ($p < 0.01$) e interação tempo vs. amostra ($p < 0.01$). Amostras seguidas da mesma letra (minúscula) e tempos seguidos da mesma letra (maiúscula) não apresentam diferença significativa ($p > 0.01$).

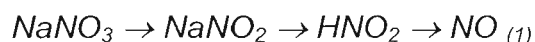
4. DISCUSSÃO

• Por que o crescimento de bactérias lácticas a partir do 15º dia não foi acompanhado de redução de pH nas amostras?

Sabe-se que as bactérias lácticas utilizam a glicose como principal substrato para fermentação, resultando na formação de ácido láctico como produto final (PÉREZ-CHABLEA et al., 2008). Dessa forma, a fécula de mandioca e a malto-dextrina utilizadas, nas formulações deste estudo, foram os principais substratos usados na fermentação láctica. Segundo Pérez-Chabela et al. (2008), valores de a_w de 0.96 e pH próximo a 6.0, favorecem o processo de fermentação. Sendo assim, como o pH das salsichas, deste estudo, variaram entre 6.4 e 6.8 e a atividade de água permaneceu com valores próximos a 0.94, pode-se sugerir que essas condições promoveram o aumento do número de bactérias lácticas nessas amostras a partir de 15 dias. Em geral, quanto maior o número de bactérias lácticas, maior a formação de ácido láctico e, conseqüentemente, redução do valor de pH. Essa tendência não foi observada nas amostras deste estudo, pois, apesar de haver aumento da contagem de bactérias lácticas, após 15 dias de armazenamento (**Tabela 6**), os valores de pH foram crescentes (**Figura 5**) nesse mesmo período. Segundo Georgentelis et al. (2007), o aumento do pH durante a estocagem de alimentos pode ser relacionado ao aumento do número de outras bactérias e/ou leveduras, que, além de fermentar, são capazes de degradar proteínas e amino ácidos resultando na formação de amônia. Deve-se ressaltar que os valores de pH encontrados neste trabalho foram similares aos observados por outros autores. Papadima & Bloukas (1999) em um estudo com salsichas tipo “gregas”, observaram ligeiro aumento dos valores de pH, passando de 6.24 a 6.48 após 21 dias de armazenamento, enquanto Bloukas et al. (1993), observaram que o pH de salsichas fermentadas foi em média de 6.5 quando armazenamento a 4°C. Portanto, pode-se sugerir que apesar do aumento do número de bactérias lácticas, a fermentação não atingiu níveis suficientes para reduzir o valor de pH, durante o armazenamento.

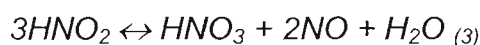
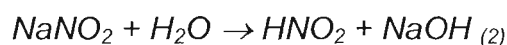
▪ **Por que a amostra controle (CT) apresentou uma coloração mais clara e mais avermelhada que as demais amostras?**

Sabe-se que a cor avermelhada ou rósea dos embutidos pode ser atribuída à formação de nitrosilmioglobina ou nitrrosilhemocromo, durante o processo de cura (PAPADIMA & BLOUKAS, 1999). A reação básica do processo de cura ocorre a partir da reação do óxido nítrico (NO) com a porção heme da mioglobina que, após aquecimento forma a nitrosil hemocromo, responsável pela coloração rósea (JUDGE, 1975; ROÇA, 2000; SAHIDI, 1992). O NO é, geralmente, formado a partir da redução do nitrato de sódio (NO₃) a nitrito de sódio (NO₂) por ação de bactérias em pH 5.0 a 6.0 (1).

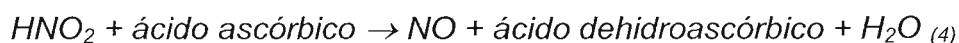


(Nitrato de sódio → nitrito de sódio → ácido nitroso → óxido nítrico)

A adição de nitrito no meio torna o processo mais rápido uma vez que não ocorre a etapa de redução do nitrato a nitrito. A formação de óxido nítrico pode ocorrer por diferentes vias. Em solução aquosa e em pH entre 5.0 e 6.0, o nitrito está presente na forma de ácido nitroso (2) o qual se decompõe a óxido nítrico, a partir da ação de enzimas, que aceleram a reação e, de substâncias que pode agir como agentes redutores (3) (JUDGE, 1975; ROÇA, 2000; SAHIDI, 1992).



O nitrito, na forma de ácido nitroso, pode, então, ser reduzido a óxido nítrico pela ação agentes redutores como sais de sódio e ácido ascórbico, capazes de doar elétrons para o ácido nitroso. Dessa forma, a reação para formação de NO é favorecida pela presença de ácido ascórbico, eritorbato de sódio ou ácido eritórbico (4) (JUDGE, 1975; ROÇA, 2000; SAHIDI, 1992).



A presença desses agentes redutores pode ainda favorecer o processo de cura a partir da doação de elétrons, diretamente, para a metamioglobina, reduzindo o Fe^{+3} a Fe^{+2} , formando, então, nitrosilhemocromo, a qual apresenta coloração rosa. Esse processo pode ocorrer por diferentes vias conforme o esquema da **Figura 13**.

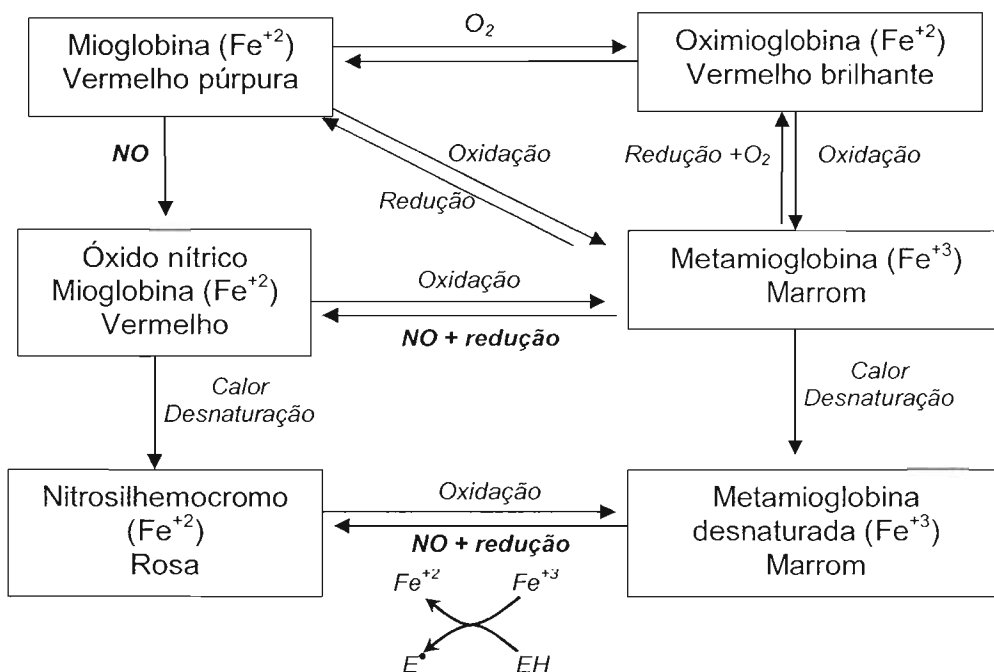


Figura 13. Modificações químicas da mioglobina durante as reações do processo de cura (adaptado de Judge, 1975). EH: eritorbato de sódio, E^\bullet : eritorbato radical.

Sendo assim, pode-se afirmar que o eritorbato de sódio utilizado como antioxidante, na amostra CT, auxiliou na formação da cor atuando como coadjuvante na ação do nitrito no processo de cura (SAHIDI, 1992; PEGG & SHAHIDI et al., 2000), aumentando assim os valores de a^* (**Figura 7**) e reduzindo, conseqüentemente, os valores de b^* (**Figura 8**). Além disso, o eritorbato é um composto capaz de quelar metais como ferro, presentes na emulsão, retardando o processo de oxidação e mantendo os valores de a^* e L^* estáveis (**Figuras 6 e 7**), durante o armazenamento (HOZ et al., 2004). Deve-se ressaltar que a menor tonalidade vermelha da amostra H800 (**Figura 7**), pode ser atribuída à cor do extrato de alecrim utilizado como fonte de ácido carnósico nas salsichas H500 e H800, o qual apresentava tonalidade verde, conforme descrito anteriormente.

▪ **Por que após 30 dias as salsichas começaram a ficar mais amarelas? Por que a L800 foi a que apresentou maior valor b^* ?**

Observa-se, na **Figura 8**, um aumento significativo no valor b^* nas amostras partir de 30 dias de armazenamento, destacando-se a amostra L800 que apresentou os maiores valores nesse período. Sabe-se que a presença de eritorbato de sódio aumenta a tonalidade vermelha devido à sua atuação como catalisador na formação de óxido nítrico, no processo de cura, conforme descrito anteriormente. Entretanto, os fenólicos dessas misturas não atuam na mesma via que o eritorbato, no processo de cura, e, além disso, a cor natural dessas substâncias pode ter mascarado a cura natural, uma vez que todas as formulações receberam nitrito e nitrato de sódio. Dessa forma, o aumento dos valores de b^* nas amostras após 30 dias (**Figura 8**), pode ser justificado pela presença de cor (verde ou amarela) dos antioxidantes naturais (ácido carnósico, quercetina e rutina), sendo que o maior valor de b^* para a L800 pode ser atribuído à maior concentração da mistura quercetina + rutina (800 mg/Kg), a qual apresentava forte coloração amarela. Alguns autores afirmam, ainda, que o excesso de flavonóides favorece a reação com proteínas, como a mioglobina (Fe^{+2}), oxidando-a e formando metamioglobina (Fe^{+3}). O excesso de metamioglobina pode reduzir o valor de a^* e, conseqüentemente, aumentar o valor de b^* (VALENCIA et al., 2008; MARTINÉZ et al., 2006). De acordo com Valencia et al (2008), a adição de catequinas de chá verde ou catequinas de café verde em salsichas reduziu os valores de a^* e aumentou os valores de b^* das amostras, após 7 dias de estocagem, comparadas ao controle, devido a capacidade de formar metamioglobina, a partir de reações com os flavonóides dos extratos. Sendo assim, esse conjunto de hipóteses pode contribuir para justificar o aumento da tonalidade amarela, a partir de 30 dias, nas amostras elaboradas com antioxidantes naturais.

▪ **Quais parâmetros podem ter influenciado a resposta sensorial dos provadores na comparação geral das amostras com o controle (CT)?**

A maior diferença da amostra H800 para a amostra CT (**Figura 11**) pode ser associada, principalmente, à coloração mais esverdeada (**Figura 7**), ao odor forte característico de alecrim e também ao odor de ranço referido pelos provadores, que se desenvolveu ao longo do armazenamento. Nesse caso, poderia se supor que a

mistura ácido cafeico + ácido carnósico (H800) pode não ter sido eficiente para inibir o processo de oxidação ou pode ainda ter atuado como pró-oxidante devido à alta concentração desses compostos. Estévez & Cava (2004), observaram tendência pró-oxidante ao adicionar óleo essencial de alecrim em salsichas, ou seja, a menor concentração de óleo essencial (150 ppm) promoveu menor formação de peróxidos e menores valores de TBARS, enquanto as maiores concentrações (300 e 600 ppm) resultaram em um efeito pró-oxidante. Porém, observou-se que a amostra H800 não apresentou os maiores valores de TBARS, descartando, assim, a hipótese de efeito pró-oxidante e, conseqüente, diferenciação pelos provadores pelo odor característico de oxidação lipídica. Gray e Pearson (1987) afirmaram que o odor de rancidez pode ser, inicialmente, detectado em produtos cárneos, quando o valor de TBARS está entre 0.5 e 2.0 mg/Kg. Porém, Boles e Parrish (1990), reportaram *off-flavor* característico de ranço quando o valor de TBARS foi maior que 1.0 mg/Kg em amostras cozidas. Entretanto, neste estudo nenhuma amostra apresentou resultados de TBARS acima de 0.5 mg/kg amostra (**Figura 12**), e a amostra H800 não foi a que apresentou maior valor de TBARS em 45 dias (0.33 ± 0.00 mg MDA/Kg amostra). Dessa forma, para se fazer a associação entre os resultados de análise sensorial e o odor característico de ranço seria necessário analisar os compostos formados a partir da degradação de produtos primários da oxidação, como, por exemplo, hexanal e propanal (ESTÉVEZ & CAVA, 2004; ESTÉVEZ et al., 2006; FRANKEL, 2005).

É importante ressaltar que os resultados obtidos na análise sensorial não se correlacionam com o parâmetro textura, pois a amostra H800 foi a que apresentou maior diferença da amostra controle na análise sensorial e sua dureza não diferiu significativamente da amostra CT, tanto crua como cozida, aos 45 dias. No entanto, a amostra L500 que diferiu significativamente da CT ($p < 0.01$) no parâmetro textura, foi a amostra sensorialmente similar com a CT. O possível aumento dos valores de dureza das amostras H800 e CT, a partir de 30 dias (cruas e cozidas), pode ser associado às condições de armazenamento e à perda de umidade das amostras. Todavia, outros parâmetros, tais como capacidade de retenção de água e variação de umidade durante o *shelf life*, deveriam ter sido analisados, a fim de justificar melhor o comportamento da dureza das amostras deste estudo. De acordo com Herrero et al. (2008), resultados de dureza com valores próximos a 50 Newtons (N)

representam manutenção da textura e da qualidade de salsichas e, portanto, apesar das variações observadas, pode-se dizer que todas as amostras apresentaram textura adequada para comercialização, pois os valores médios permaneceram acima de 50 N. Pode-se concluir que os atributos de cor e odor foram determinados na avaliação das amostras pelos provadores e no caso, do odor, tanto a caracterização do alecrim como o odor típico de oxidação de carnes contribuíram para os resultados observados nessa análise.

▪ **Por que os compostos fenólicos avaliados neste estudo foram mais eficientes que o eritorbato de sódio na redução da formação de TBARS?**

A **Figura 12** mostra que os compostos fenólicos foram mais eficientes do que o eritorbato de sódio na redução da formação de TBARS, uma vez que seus valores permaneceram abaixo dos valores encontrados para a amostra controle (CT). Considerando-se que a interação entre os hidroperóxidos formados na superfície da gota emulsionada com metais presentes na fase aquosa, é uma das principais causas da oxidação lipídica em emulsões, a eficiência de um antioxidante, nesse sistema irá depender da sua concentração, do tipo de molécula, da sua solubilidade e, conseqüentemente, da sua localização (McCLEMENTS & DECKER, 2000). Em emulsões óleo em água (O/A), os antioxidantes hidrossolúveis (ex. eritorbato de sódio) são capazes de quelar metais de transição presentes na fase aquosa prevenindo seu acesso ao substrato lipídico emulsificado (MAHONEY & GRAF, 1986; McCLEMENTS et al., 2000), enquanto os antioxidantes lipofílicos (exemplo: α -tocoferol) se localizam na interface óleo-água (hipótese do *paradoxo polar*) podendo apresentar maior eficiência (ALAMED et al., 2009; ALTUNKAYA et al., 2009; FRANKEL, 2005). Os flavonóides hidro ou lipossolúveis, de forma geral, podem atuar como quelantes de metais, como *radical scavenger* e/ou como *chain-breaking* dependendo do sistema em que são aplicados (FRANKEL, 2005; DENISOV & AFANA'S EV, 2005) exibindo assim, maior eficiência em inibir a formação de TBARS. Além disso, os radicais intermediários formados por esses compostos são estáveis o que previne a formação de novos radicais (AMMAR, 2009; FRANKEL, 2005; DENISOV & AFANA'S EV, 2005). Alguns autores afirmam, ainda, que o resíduo de açúcar ligado à posição 3 do anel C da rutina torna-a mais solúvel que a quercetina (BECKER et al., 2007) e essa diferença de polaridade entre

compostos promove diferente distribuição nas fases da emulsão exibindo efeito sinérgico (FRANKEL, 2005; AMMAR et al., 2009). Sendo assim, sugere-se que o eritorbato de sódio atuou exclusivamente como quelante de metais na fase aquosa, reduzindo, assim, a sua atividade antioxidante na emulsão, quando comparado aos compostos fenólicos. Em um estudo anterior (CAPITANI et al., 2009a), esse mesmo composto apresentou baixa eficiência em inibir a formação de TBARS, quando avaliado por métodos que utilizaram emulsão com ácido linoléico (LAOX) e homogenato de frango, sugerindo uma atividade antioxidante reduzida, quando aplicado em matrizes complexas.

Observa-se na **Figura 12**, que a mistura quercetina + rutina, quando aplicada em menor concentração (500 mg/Kg), foi a mais eficiente em reduzir os valores de TBARS em 45 dias. Ao comparar os resultados da amostra L500 com a L800, pode-se dizer que a maior concentração de antioxidantes na amostra L800 (800 mg/Kg) pode não ter apresentado eficiência para inibir o processo de oxidação ou pode ainda ter atuado como pró-oxidante devido à sua alta concentração, aumentando assim os valores de TBARS. Estévez et al. (2004), observaram tendência pró-oxidante ao adicionar óleo essencial de alecrim em salsichas, ou seja, a menor concentração de óleo essencial (150 ppm) promoveu menor formação de peróxidos e menores valores de TBARS, enquanto as maiores concentrações (300 e 600 ppm) resultaram em um efeito pró-oxidante.

5 CONCLUSÕES

Em relação à estabilidade oxidativa, ambas misturas (hidro e lipossolúveis), em ambas dosagens (500 e 800 mg/Kg), apresentaram menores concentrações de TBARS que a amostra formulada com o antioxidante artificial durante o *shelf life*. Entretanto, os compostos fenólicos parecem não exercer a função de fixação da cor durante o processo de cura proporcionado pelo eritorbato de sódio. Considerando-se o resultado da análise sensorial como critério de viabilidade, as amostras preparadas com a mistura quercetina + rutina na dosagem 500 mg/Kg, apresentou-se como melhor alternativa de substituição do eritorbato de sódio na formulação de salsichas tipo *hot dog*.

REFERÊNCIAS

1. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Portaria n.593, de 25 de agosto de 2000**. Aprova o Regimento Interno e o Quadro Demonstrativo de Cargos em Comissão da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18564&word=>. Acesso em: 10 nov. 2006.
2. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução n.12 de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. Acesso em: 10 abr. 2009.
3. AGUIRREZÁBAL, M.M.; MATEO, J.; DOMÍNGUEZ, M.C.; ZUMALACÁRREGUI, J.M. The effect of paprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. **Meat Science**, v.54, p.77-81, 2000.
4. ALAMED, J.; WILAILUK, C.; MC CLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Relationship between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.2969-2976, 2009.
5. ALTUNKAYA, A.; BECKER, E.M.; GOKMEN, V.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant activity of lettuce extract (*lactuca sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v.115, p.163-168, 2009.
6. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4.ed. Champaign: AOCS, 1987. v.1. [AOCS Official Method Cd 8-53 American Oil Chemists' Society].
7. AMMAR, R.B.; BHOURI, W.; SGHAIER, M.B.; BOUBAKER, J.; SKANDRANI, I.; NEFFATI, A.; BOUHLEL, I.; KILANI, S.; MARIOOTE, A.M.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; DIJOUX-FRANCA, M.G.; GHEDIRA, K. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from leaves of *Rhamnus alaternus L.* (Rhamnaceae): a structure-activity relationship study. **Food Chemistry**, v.116, p.258-264, 2009.
8. ANSONERA, D.; ASTIASARÁN, I. Effect of storage and packing on fatty acid composition and oxidation in dry fermented sausage made with added olive oil and antioxidants. **Meat Science**, v.67, p.237-244, 2004.
9. ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGERS, J. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. **Xenobiotica**, v.22, p.257-268, 1992.
10. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1995.
11. AXELROD, B.; CHEESBROUGHT, T.M.; LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybeans. **Methods in Enzymology**, v.71, p.441-451, 1981.
12. BÉCKER, E.M.; NTOUMA, G.; SKIBSTED, L.H. Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organization. **Food Chemistry**, v.103, p.1288-1296, 2007.
13. BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous

- measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, v.299, p.15–27, 1999.
14. BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the DRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, p.70-76, 1996.
 15. BERGAMO, P.; FEDELE, E.; BALESTRIERI, M.; ABRESCIA, P.; FERRARA, L. Measurement of malondhyaldehyde levels in food by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.2171, 1998.
 16. BERIAN, M.J.; CHASCO, J.; LISAZO, G. Relationship between biochemical and sensory quality characteristics of different commercial brands of salchichón. **Food Control**, v.11, p.231–237, 2000.
 17. BLOUKAS, J.G.; PANERAS, E.D. Substituting olive oil for pork backfat affects quality of low-fat frankfurters. **Journal of Food Science**, v.58, p.705-709, 1993.
 18. BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 1995. 145p.
 19. BOLES, J.A.; PARISH Jr., F.C. Sensory and chemical characteristics of precooked microwave reheatable pork roasts. **Journal of Food Science**, v.55, p.618-620, 1990.
 20. BOOT, A.W.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v.585, p.325-337, 2008.
 21. BOTTERWECK, A.A.M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R.A.; KLEINJANS, J.; VAN DEN BRANDT, P.A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v.38, n.7, p.599-605, 2000.
 22. BOX G.E.P.; WILSON, K.B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society, Series B: Statistical Methodology**, v.13, n.1, p.1-45, 1951.
 23. BOZKURT, H. Utilization of natural antioxidants: green tea extract and *Thymbra spicata* oil in Turkish dry-fermented sausage. **Meat Science**, v.73, p.442–450, 2006.
 24. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technology**, v.28, p.25-30, 1995.
 25. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.51, de 29 de dezembro de 2007**. Adota o Regulamento Técnico de Atribuição de Aditivos, e seus Limites das seguintes Categorias de Alimentos 8: Carne e Produtos Cárneos. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17560>. Acesso em: 08 ago. 2008.
 26. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. SISLEGIS. **Instrução Normativa n.4, de 31 de março de 2000**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7778>. Acesso em: 08 ago. 2008.

27. BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of Mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v.40, p.393–405, 2007.
28. BREENE, W.M. Applications of texture profile analysis to instrumental food texture evaluation. **Journal of Texture Studies**, v.6, p.53-82, 1975.
29. BUCHNER, N.; KRUMBEIN, A.; ROHN, S.; KROH, L.W. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.20, p.3229-3235, 2006
30. CAO, G.; VERDON, C.P.; WU, A.H.B.; WAY, H.; PRIOR, R.L. Automated assay for oxygen radical absorbance capacity with CONAS FARA II. **Clinical Chemistry**, v.41, p.1738-1744, 1995.
31. CAPITANI, C.D.; CARVALHO, A.C.L.; BOTELHO, P.B.; CARRAPEIRO, M.M.; CASTRO, I.A. Synergism on antioxidant activity between natural compounds optimized by response surface methodology. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.111, 2009. [No prelo].
32. CAPITANI, C.D.; CARVALHO, A.C.L.; RIVELLI, D.P.; BARROS, S.B.M.; CASTRO, I.A. Evaluation of natural and synthetic compounds according to their antioxidant activity using a multivariate approach. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.111, 2009a. [No prelo].
33. CARLSEN, C.U.; MOLLER, J.K.S.; SKIBSTED, L.H. Heme-iron in lipid oxidation. **Coordination Chemistry Reviews**, v.249, p.458-498, 2005.
34. CASTRO, I.A.; MORAES BARROS, S.B.; LANFER MARQUEZ, U.M.; MOTIZUKI, M.; HIGASHI SAWADA, T.C. Optimization of the antioxidant capacity of a mixture of carotenoyds and α -tocopherol in the development of a nutritional supplement. **Food Research International**, v.38, p.861-866, 2005.
35. CASTRO, I.A.; ROGERO, M.M.; JUNQUEIRA, R.M.; CARRAPEIRO, M.M. 2,2-Diphenyl-1-picrylhidrazil free radical scavenging activity of antioxidant mixtures evaluated by response surface methodology. **International Journal of Food Science & Technology**, v.41, p.59-67, 2006b.
36. CASTRO, I.A.; ROGERO, M.M.; JUNQUEIRA, R.M.; CARRAPEIRO, M.M. Free radical scavenger and antioxidant capacity correlation of α -tocopherol and trolox measured by three *in vitro* methodologies. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.57, p.75-82, 2006a.
37. CHAILLOU, L.L.; NAZARENO, M.A. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.8397-8402, 2006.
38. CHAIYASIT, W.; MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. The relationship between the physicochemical properties of antioxidants and their ability to inhibit lipid oxidation in bulk oil and oil –in- water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4982–4988, 2005.
39. CORNELL, J.A. **Experiments with mixtures**: designs, models and the analysis of mixture data. 3.ed. New York: John Wiley, 2002. 649p. (Wiley series in probability and statistics).

40. CURT, C.; FRANCON, C.; TRYSTRAM, G. Optimization of the chopping process using at-line human evaluations and response surface methodology. **International Journal of Food Science & Technology**, v.39, p.1043, 2004.
41. DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CÓRDOVES, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of oxygen radical absorbance capacity (ORAC fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.48-54, 2004.
42. DENISOV, E.T.; AFANAS'EV, I.B. **Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. 981p.
43. DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v.12, p.214-219, 1980.
44. DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Health Association, 2001. 676p.
45. DRUSCH, S.; GROB, N.; SCHWARZ, K. Efficient stabilization of bulk fish oil rich in long – chain polyunsaturated fatty acids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, p.351-359, 2008.
46. ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**, v.110, p.76-82, 2008.
47. ESTÉVEZ, M.; CAVA, R. Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: contradictory effects in different types of frankfurters. **Meat Science**, v.72, p.348-355, 2004.
48. ESTÉVEZ, M.; VENTANAS, S.; CAVA, R. Effect of natural and synthetic antioxidants on protein oxidation and colour and texture changes in refrigerated stored porcine liver pâté. **Meat Science**, v.74, p.396-403, 2006.
49. FENAILLE, F.; MOTTIER, P.; TURESKY, R.J.; ALI, S.; GUY, P.A. Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. **Journal of Chromatography, A**, v.921, p.237-245, 2001.
50. FENNEMA, O.R., ed. **Food chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. 1067p. (Food science and technology).
51. FIGUEIREDO, V.O.; GASPAR, A.; BORGES, S.V.; MODESTA, S.C.D. Influência dos substitutos de gordura animal sobre a qualidade da salsicha tipo Viena. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, p.11-17, 2002.
52. FOTI, M.C.; DAQUINO, C.; GERACI, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH[•] radical in alcoholic solutions. **Journal of Organic Chemistry**, v.69, p.309-2314, 2004.
53. FRANKEL, E.N. **Lipid oxidation**. 2.ed. Bridgewater: Oily Press, 2005. 470p. (Oily Press lipid library, v.18).
54. FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.13, p.1925-1941, 2000.

55. GEORGENTELIS, D.; AMBROSIADIS, I.; KATIKOU, P.; BLEKAS, G.; GEORGAKIS, S.A. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. **Meat Science**, v.76, p.172-181, 2007.
56. GIL, M.A.; TOMAS-BARBERAN, F.A.; HESS-PIERCE, B.; KADER, A.A. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach and plum cultivar from California. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.4976-4982, 2002.
57. GRAY, J.I.; PEARSON, A.M. Cured meat flavour. **Advances in Food Research**, v.29, p.1-72, 1984.
58. GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v.217, p.213-220, 2006.
59. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford Science Publications, 2004. 936p.
60. HEIJNEN, C.G.; HAENEN, G.R.M.M.; OSTTVEEN, R.M.; STALPERS, E.M.; BAST, A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. **Free Radical Research**, v.36, p.575-581, 2002.
61. HEO, H.J.; KIM, Y.J.; CHUNG, D.; KIM, D. Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. **Food Chemistry**, v.104, p.87-92, 2007.
62. HERRERO, A.M.; LA HOZ, L.; ORDÓÑEZ, J.A.; HERRANZ, B.; ÁVILA, R.; CAMBERO, M.I. Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics. **Meat Science**, v.80, p.690-696, 2008.
63. HORN, A.F.; NIELSEN, N.S.; JACOBSEN, C. Additions of caffeic acid, ascorbyl palmitate or tocopherol to fish oil-enriched energy bars affect lipid oxidation differently. **Food Chemistry**, v.112, p.412-420, 2009.
64. HOZ, L.; D'ARRIGO, M.; CAMBERO, I.; ORDÓÑEZ, J.A. Development of an n-3 fatty acid and α -tocopherol enriched dry fermented sausage. **Meat Science**, v.67, p.485-495, 2004.
65. HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays: reviews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.
66. HUDSON, B.J.F., ed. **Food antioxidants**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1990. 317p.
67. IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.21, p.589-598, 2008.
68. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisas. Síntese das Pesquisas. Pesquisa de Orçamentos Familiares (População). Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2002-2003: Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. **Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2002-2003**. Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002analise/default.shtm>. Acesso em: 24 mar. 2009.

69. ISMAIL, H.A.; LEE, E.J.; KO, K.Y.; AHN, D.U. Effects of aging time and natural antioxidants on the color, lipid oxidation and volatile of irradiated ground beef. **Meat Science**, v.80, p.582-591, 2008.
70. JAYALAKSHMI, C.P.; SHARMA, J.D. Effect of butylated hydroxyanisole (BHA) and Butylated Hydroxytoluene (BHT) on rat erythrocytes. **Environmental Research**, v.41, p.235-238, 1986.
71. JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis**. 3.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1992. 799p.
72. JORGE, N.; GONÇALVES, L.A.G. Aditivos utilizados em óleos e gorduras de frituras. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.32, n.1, p.40-47, 1998.
73. JUDGE, M.D. **Principles of meat science**. 2.ed. Dubuque: Kendall/Hunt, 1975. 351p.
74. JUSTINO, G.C.; CORREIA, C.F.; MIRA, L.; BORGES DOS SANTOS, R.M.; SIMÕES, J.A.; SILVA, A.M.; SANTOS, C.; GIGANTE, B. Antioxidant activity of a catechol derived from abietic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.342-348, 2006.
75. KAO, T.; CHEN, B. Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.7544-7555, 2006.
76. LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v.46, p.244-282, 2007.
77. LARSON, R.A. **Naturally occurring antioxidants**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1997. 195p.
78. LEE, H.; LEE, K.; JUNG, J.K.; CHO, J.; THEODORAKIS, E.A. Synthesis and evaluation of 6-hydroxy-7-methoxy-4-chromanone and chroman-2-carboximides as antioxidants. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.29, p.900-912, 2005.
79. LIU, D.; SHI, J.; IBARRA, A.C.; KAKUDA, Y.; XUE, S.J. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C and β -carotene mixtures on DPPH free radical. **LWT-Food Science and Technology**, v.41, p.1344-1349, 2008.
80. LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinica Chimica Acta**, v.380, p.50-58, 2007.
81. MAHONEY, J.R.; GRAF, E. Role of α -tocopherol, ascorbic acid, citric acid and EDTA as antioxidants in model system. **Journal of Food Science**, v.51, p.1239-1296, 1986.
82. MARINOVA, E.M.; TONEVA, A.; YANISHLIEVA, N. Comparison of the antioxidant properties of caffeic and chlorogenic acids. **Food Chemistry**, v.114, p.1498-1502, 2009.
83. MARTINÉZ, L.; DJENANE, D.; CILLA, I.; BELTRÁN, J.A.; RONCÁLES, P. Effect of varying oxygen concentrations on the shelf-life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. **Food Chemistry**, v.94, n.2, p.219-225, 2006.
84. Mc CLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. **Journal of Food Science**, v.65, p.1270-1282, 2000.

85. MEI, L.Y.; DECKER, E.A.; Mc CLEMENTS, D.J. Evidence of iron association with emulsion droplets and its impact on lipid oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.5072-5077, 1998.
86. MELO FILHO, A.B.; BISCANTINI, T.M.B.; ANDRADE, S.A.C. Níveis de nitrito e nitrato em salsichas comercializadas na região metropolitana do Recife. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p.390-392, 2004.
87. MEYER, A.S.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N. Antioxidant interactions of catechin, cyaniding, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. **Food Chemistry**, v.61, p.71-75, 1998.
88. MILLER, D.D. **Food chemistry: a laboratory manual**. New York: John Wiley, 1998. 168p.
89. NAGUIB, Y.M.A. A fluorimetric method for measurement of oxygen radical-scavenging activity of water-soluble antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v.284, p.938-943, 2000.
90. NAZ, S.; SIDDIQI, R.; SHEIKH, H.; SAYEED, S.A. Deterioration of olive, corn and soybean oils due to air, light, heat and deep-frying. **Food Research International**, v.38, p.127-134, 2005.
91. NENADIS, N.; LAZARIDOU, O.; TSIMIDOU, M.Z. Use of reference compounds in antioxidant assessment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.5452-5460, 2007.
92. OLIVO, R. Emulsões cárneas. In: OLIVO, R., ed. **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. Criciúma: Editora do Autor, 2006. p.405-414.
93. ORDOÑEZ, J.A.; HIERRO, E.M.; BRUNA, J.M.; DE LA HOZ, L. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.39, n.4, p.329-367, 1999.
94. OSBORN-BARNES, H.T.; AKOH, C.C. Effects of α -Tocopherol and β -Carotene, and soy isoflavones on lipid oxidation of structured lipid-based emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.23, p.6856-6860, 2003.
95. OSBORN-BARNES, H.T.; AKOH, C.C. Effects of alpha-tocopherol, beta-carotene, and soy isoflavones on lipid oxidation of structured lipid-based emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.6856-6860, 2003.
96. OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4619-4626, 2001.
97. OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3122-3128, 2002.
98. PAPANIMA, S.N.; BLOUKAS, J.G. Effect of fat level and storage conditions on quality characteristics of traditional Greek sausages. **Meat Science**, v.51, p.103-113, 1999.
99. PEGG, R.B.; SHAHIDI, F. **Nitrite curing of meat: the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives**. Trumbull: Food & Nutrition Press, 2000. 268p. (Publications in food science and nutrition).

110. PEÑA-RAMOS, E.A.; XIONG, Y.L. Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. **Meat Science**, v.64, p.259-263, 2003.
111. PÉREZ-CHABELA, M.L.; TOTOSAUS, A.; GUERRERO, I. Evaluation of thermotolerant capacity of lactic acid bacteria isolated from commercial sausages and the effects of their addition on the quality of cooked sausages. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.132-138, 2008.
112. PÉREZ-JIMENEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ-RUBIO, E.; SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant, foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v.41, p.274-285, 2008.
113. PÉREZ-JIMENÉZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assay. **Food Research International**, v.39, p.791-800, 2006.
114. PRECISE color communications: color control from feeling to instrumentation. Osaka: Minolta, 1994. 49p.
115. PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by modified ferring reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3396-3402, 2000.
116. RAMADAN, M.F. Quercetin increases antioxidant activity of soy lecithin in a triolein model system. **LWT-Food Science and Technology**, v.41, p.581-587, 2008.
117. RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.29, p.755-760, 2006.
118. RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavanoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, p.933-956, 1996.
119. ROÇA, R.O. **Tecnologia de carne e produtos derivados**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas/UNESP, 2000. 202p.
120. RÓZEK, A.; ACHAERANDIO, I.; ALMAJANO, M.P.; GÜELL, C.; LÓPEZ, F.; FERRANDO, M. Solid foodstuff supplemented with phenolics from grape: antioxidant properties and correlation with phenolic profiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.5147-5155, 2007.
121. RUBIO, B.; MARTINÉZ, B.; GARCÍA-CACHÁN, M.D.; ROVIRA, J.; JAIME, I. Effect of the packing method and storage time on lipid oxidation and colour stability on dry fermented sausage salchichón manufactured with raw material with a high level of mono and polyunsaturated fatty acids. **Meat Science**, v.80, p.1182-1187, 2008.
122. SAHIDI, F.; RUBIN, L.J.; DIOSADY, L.L.; WOOD, D.F. Effect of sulfonilamide on TBA values of cured meats. **Journal of Food Science**, v.50, p.274-275, 1985.
123. SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8, p.121-137, 2002.
124. SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p.270-276, 1998.

125. SCHUT, J. Meat emulsions. In: FRIBERG, S., ed. **Food Emulsions**. New York, Basel: Marcel Dekker, 1976. p.385-458. (Food science, v.5).
126. SEBRANEK, J.G.; SEWALT, V.J.H.; ROBBINS, K.L.; HOUSER, T.A. Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. **Meat Science**, v.69, p.289-296, 2005.
127. SEPPANEN, C.M.; CSALLANY, A.S. Formation of 4-hydroxynonenal, a toxic aldehyde, in soybean oil at frying temperature. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.79, p.1033-1038, 2002.
128. SERRANO, J.; GONI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimated the physiological antioxidant capacity. **Food Research International**, v.40, p.15-21, 2007.
129. SHAHID, F.; PEGG, R.B. Nitrite-free meat curing systems: update and review. **Food Chemistry**, v.43, p.185-191, 1992.
130. SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.
131. SORENSEN, A.M.; HAAHR, A.; BECKER, E.M.; SKIBSTED, L.H.; BERGENSTAHL, B.; NILSSON, L. Interactions between iron, phenolic compounds, emulsifiers, and pH in omega-3-enriched oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.1740-1750, 2008.
132. SOUBRA, L.; SARKIS, D.; HILAN, C.; VERGER, P. Dietary exposure of children and teenagers to benzoates, sulphites, butylhydroxyanisole (BHA) and butylhydroxytoluene (BHT) in Beirut (Lebanon). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.47, p.68-77, 2007.
133. SOUSA, W.; ROCHA, C.; CARDOSO, L.; SILVA, D.H.S.; ZANONI, M.V.B. Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.17, p.619-633, 2004.
134. SUH, H.J.; CHUNG, M.S.; CHO, Y.H.; KIM, J.W.; KIM, D.H.; HAN, K.W.; KIM, J. Estimated daily intakes of butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) and tert-butyl hydroquinone (TBHQ) antioxidants in Korea. **Food Additives & Contaminants**, v.22, p.1176-1188, 2005.
135. SUN, B.; FUKUHARA, M. Effects of co-administration of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole and flavonoids on the activation of mutagens and drug-metabolizing enzyme in mice. **Toxicology**, v.122, p.61-72, 1997.
136. SURH, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews. Cancer**, v.3, n.10, p.768-780, 2003.
137. TABART, J.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J.O.; DOMMES, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chemistry**, v.113, n.4, p.1226-1233, 2008.
138. THAIPONG, K.; BOOPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.669-675, 2006.

139. TONG, L.M.; SASAKI, S.; McClements, D.J.; DECKER, E.A. Antioxidant activity of whey in a salmon oil emulsion. **Journal of Food Science**, v.65, p.1325-1329, 2000.
140. TURAN, B.; GÜLCEN, A.; MAKRIS, D.P.; KEFALAS, P. Interactions between quercetin and catechin in a model matrix: effects on the *in vitro* antioxidant behaviour. **Food Research International**, v.40, n.7, p.819-826, 2007.
141. VALENCIA, I.; ANSONERA, D.; ASTIASARÁN, I. Development of dry fermented sausages rich in docohexaenoic acid with oil from the microalgae *Schizochytrium* sp.: influence on nutritional properties, sensorial quality and oxidation stability. **Meat Science**, v.104, p.1087-1096, 2007
142. VALENCIA, I.; O'GRADY, M.N.; ANSONERA, D.; ASTIASARÁN, I.; KERRY, J.P. Enhancement of nutritional status and quality of fresh pork sausages following the addition of linseed oil, fish oil and natural antioxidants. **Meat Science**, v.80, p.1046-1054, 2008.
143. WACH, A.; PYRZYŃSKA, K.; BIESAGA, M. Quercetin content in some food and herbal samples. **Food Chemistry**, v.100, p.699-704, 2007.
144. WILLIAMS, G.M.; IATROPOULOS, M.; WHYSNER, J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, n.9/10, p.1027-1038, 1999.
145. WILLIS, M.S.; WIANS Jr., F.H. The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of cation of various dietary substances. **Clinica Chimica Acta**, v.330, p.57-83, 2003.
146. WIRSTA, P.; LE DIZES, C.; L'HUILIER, V.; LECORNU, C.; BOUSSARD, A. Le dosage d'acide ascorbique dans des pains. **Industries des Céréales**, v.135, p.2-6, 2003.
147. WU, X.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.M.; HAYTOWITZ, D.B.; GEBHARDT, S.E.; PRIOR, R.L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.4062-4037, 2004.
148. YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAQ, J. HPLC method for evaluation of the free radical -scavenging activity of foods by using 1,1-diphenil-2-picrylhydrazyl. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.62, p.1201-1204, 1998.
149. YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. *In vitro* antioxidant properties of rutin. **LWT-Food Science and Technology**, v.41, n.6, p.1060-1066, 2008.
150. ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; BATTAGLIA, A.; CHZZOLINI, R. Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. **Meat Science**, v.66, p.415-423, 2004.

ANEXOS

- ANEXO 1 Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado
- ANEXO 2 Aprovação do comitê de ética
- ANEXO 3 Artigo publicado no periódico *European Journal of Lipid Science and Technology* "*Evaluation of natural and synthetic compounds according to their antioxidant activity using a multivariate approach*"
- ANEXO 4 Artigo publicado no periódico *European Journal of Lipid Science and Technology* "*Synergism on antioxidant activity between natural compounds optimized by response surface methodology*"
- ANEXO 5 Cópia Ficha do Aluno (histórico escolar parcial)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP**

Ofício CEP nº 64/2007

São Paulo, 29 de maio de 2007.

Ilmo(a). Sr(a)
Caroline Dário Capitani
Orientador Profa. Inar Alves de Castro
FBA

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 28 de maio de 2007, **APROVOU** o projeto "Modelagem matemática na avaliação do sinergismo da atividade antioxidante de compostos naturais aplicados em emulsões alimentícias" (Protocolo CEP nº 421) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética Pesquisa
FCF/USP