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

Influência do processamento, de antioxidantes e da estocagem sobre a estabilidade oxidativa lipídica do ovo

MICHELLE GARCÊZ DE CARVALHO

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Alfredo Tenuta Filho

SÃO PAULO

2012

MICHELLE GARCÊZ DE CARVALHO

Influência do processamento, de antioxidantes e da estocagem sobre a estabilidade oxidativa lipídica do ovo

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Alfredo Tenuta Filho
Orientador/Presidente

Prof. Dr (a). Suzana Caetano da Silva Lannes

Prof. Dr (a). Sabria Aued Pimentel

Prof. Dr (a). Léa Silvia Sant'Ana

Prof. Dr (a). Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres

SÃO PAULO, NOVEMBRO, 2012

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

C331i

Carvalho, Michelle Garcêz de
Influência do processamento, de antioxidantes e da estocagem sobre a estabilidade oxidativa lipídica do ovo / Michelle Garcêz de Carvalho. -- São Paulo, 2012.
155p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Orientador : Tenuta Filho, Alfredo

1. Ovos : Ciência dos alimentos 2. Antioxidantes : Tecnologia de alimentos 3. Ovos : Colesterol : Ciência dos alimentos I. T. II. Tenuta Filho, Alfredo, orientador.

641.375 CDD

DEDICATÓRIA

A Deus, por ter me sustentado em todos os momentos da minha vida. Tudo o que tenho e sou devo a ele.

À minha mãe, apesar das dificuldades sempre me mostrou que se eu não fosse forte eu não venceria e que pelo esforço e fé eu alçaria meus sonhos. Sem ela eu não teria chegado tão longe.

À minha avó, através dos seus ensinamentos pude me tornar uma pessoa melhor. Muita saudades.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar todos os dias e por me fortalecer nos momentos em que eu me sentia fraca.

Ao meu orientador, Prof (o). Dr. Alfredo Tenuta Filho, pelos ensinamentos, pela paciêcia e por me conduzir da melhor maneira possível na realização deste trabalho.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, a chefe do departamento Prof. (a) Dr Beatriz Rosana Cordenunsi coordenadora do curso de Pós-Graduação e Prof. (a) Dr. Bernadette Dora Gombossy Melo Franco, pela oportunidade do meu crescimento profissional.

Ao Prof (o). Dr. Jorge Mancini Filho, por me receber na Faculdade de Ciências Farmacêuticas e me conduzir ao Prof (o). Dr. Alfredo Tenuta Filho.

À Prof. (a) Dr. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto e ao Prof (o). Dr. Felipe Rebello Lourenço, pela atenção e auxílio analítico.

AO CNPq, pela concessão da bolsa de pesquisa.

A FAPESP, pelo auxílio financeiro para realização do projeto.

A DANISCO Brasil Ltda., pelos extratos de antioxidantes.

Ao Edilson, Mônica, Cleonice, secretários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pela atenção e ajuda.

À minha mãe tão amada, Rosângela Garcêz de Araújo, pelo amor incondicional, pelos conselhos sábios e por sempre estar ao meu lado sendo meu porto seguro.

Ao irmão Maicom Garcêz de Carvalho, pelo amor, por me apoiar nas minhas decisões e por ele e minha cunhada, Cadydja Ribeiro, terem me presenteado com meu sobrinho, Enzo Rafael.

À minha irmã Raimunda Airres, pelo amor e por me presentear com minhas sobrinhas, Maria Eduarda e Micaela.

Ao meu noivo, George Sales Beleense, pelo suporte emocional, pelo carinho, pela compreensão e por ter aprendido e crescido com ele.

À família de George, pelo carinho e torcida.

À minha tia, Bernadete Araújo, por me acolher em sua casa, pelo carinho e torcida.

Aos meus amigos piauienses, Ana Mara Oliveira, Liliane Pires, Emídio, Lucíllia Rabelo e Leonardo Torres, por ser um pedacinho do Piauí para mim em São Paulo. Obrigada pelas risadas, conselhos e companhia.

Às minhas amigas de laboratório, Joana Santos, Luciene Fagundes, Luz Merida e Patrícia Borges, pelos conselhos, risadas, companhia, ajuda analítica e pelo ambiente de trabalho agradável.

À Patrícia Lara, pelos bons anos de convivência no CRUSP.

Ao laboratório de lípides, representado por Illana Louise, Fernanda Santana, Fernanda Shinagawa e Rosângela Pavan, pela atenção e pelo carinho.

Aos meus amigos, Ana Marreiros, Carlyanne Costa, Jance Lustosa, Karina Presotto, Liana Marreiros, Mainomy Carvalho, Nani Maciel, Tânya Sulamyta e Rafael Presotto, que perto ou longe sempre torceram por mim e pelo carinho.

Aos demais que direta e indiretamente contribuíram para a realização do meu trabalho.

Muito Obrigada.

Influência do processamento, de antioxidantes e da estocagem sobre a estabilidade oxidativa lipídica do ovo. 2012. 155p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2012

RESUMO

O ovo é consumido *in natura* ou processado, e usado como matéria-prima em diversos produtos. A pasteurização e a atomização são os principais processamentos aplicados ao ovo. Diferentes condições de processamento, embalagem e estocagem podem afetar a estabilidade oxidativa lipídica e reduzir a proteção antioxidante natural do ovo. O uso de embalagens onde não haja contato do ovo com a luz e oxigênio, estocagem em temperaturas baixas e uso de antioxidantes podem prevenir a oxidação lipídica. Atualmente, os antioxidantes sintéticos são cada vez mais substituídos por antioxidantes naturais ou feita uma associação entre eles. O alecrim (*Rosmarinus officinalis L*.) e o chá verde *(Camelia sinensis L)* constam entre os vegetais com grande potencial antioxidante. Com base no exposto, os objetivos do trabalho foram: a) Padronizar o método do fosfomolibdênio para avaliação da capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) do ovo; b) Investigar o efeito da pasteurização e da atomização do ovo no que se refere à capacidade antioxidante e à estabilidade oxidativa da fração lipídica do ovo; c) Avaliar a estabilidade oxidativa de ácidos graxos e a capacidade antioxidante do ovo integral pasteurizado atomizado, estocado a 5ºC, por 90 dias; d) Verificar por meio de teste de concentração de antioxidantes, a estabilidade oxidativa lipídica do ovo integral pasteurizado atomizado adicionado da mistura de extrato de alecrim, extrato de chá verde e BHA (butilato de hidroxianisol); e) Otimizar a concentração da mistura de extrato de alecrim, extrato de chá verde e BHA a ser adicionada ao ovo líquido integral pasteurizado, posteriormente atomizado, pelo modelo matemático proposto pela metodologia de superfície de resposta; f) Investigar o efeito da mistura otimizada de extrato de alecrim, extrato de chá verde e BHA na estabilidade oxidativa lipídica do ovo integral pasteurizado atomizado, estocado sob as temperaturas de 5°C e 25ºC, por 90 dias. O método do fosfomolidênio para medir a CATL do ovo apresentou adequação analítica, indicada pela equação de regressão ($y = 13,705x + 0,0808$), coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9931$), limite de detecção (0,005mg α-tocoferol/ mL), limite de quantificação (0,017mg α-tocoferol/ mL), coeficiente de correlação ($r = 0,9965$), sendo que a precisão não indicou dispersão ao redor da média. A CATL diminuiu com o progresso do processamento e o inverso foi observado quanto aos lipídios, 7-CETO (7-cetocolesterol) e TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). O ovo integral pasteurizado atomizado (OIPA) mantido sob condições de estocagem consideradas ideais permaneceu estável em relação à hidratação, a CATL e as TBARS. Pelo teste de concentração de antioxidantes, foram ensaiadas dez misturas (alecrim, chá verde e BHA) no OIPA e refletiu na sua estabilidade oxidativa lipídica, verificada pelas TBARS, CATL, CT-F (capacidade redutora pelo reativo de Folin – Ciocalteau), AGL (ácidos graxos livres) e AS-233 (substâncias absorvidas a 233 nm). Os resultados mostraram que a metodologia de superfície de resposta (RSM) foi adequada para descrever a formação dos AGL e AS-233 no OIPA, podendo serem usadas para fins preditivos. A otimização da mistura de antioxidantes baseou-se no modelo matemático obtido com as AS-233, onde foi proposto como sistema antioxidante 150ppm de BHA, 600ppm de alecrim e 300ppm de chá verde. As

condições de estocagem adotadas e a adição dos antioxidantes foram efetivas para manter estável o OIPA, sendo mais efetivo quando estocado a 5°C. Concluíu-se que o método do fosfomolibdênio apresentou adequação analítica. A pasteurização não afetou os parâmetros analisados (lipídios, TBARS, CATL e 7-CETO), mas a atomização provocou diminuição significativa da CATL, e elevação dos lipídios, TBARS e 7-CETO. Foi mantida a hidratação e a estabilidade oxidativa do OIPA estocado por 90 dias a 5°C, indicando que as condições de embalagem e estocagem foram efetivas. Pelo modelo matemático proposto pela RSM foi constatado que apenas os AGL e AS-233 podem ser usados para fins preditivos, optando-se pela otimização da concentração da mistura de antioxidantes, usando apenas o modelo matemático obtido nas AS-233. Com a presença ou não de antioxidantes, o OIPA estocado a 5°C, ao longo dos 90 dias, apresentou-se mais estável quanto à hidratação e à oxidação lipídica.

Palavras-chave: ovo, pasteurização, atomização, extrato de alecrim, extrato de chá verde, BHA, embalagem sob nitrogênio gasoso, estocagem e oxidação lipídica.

Influence of processing, antioxidants and storage on oxidative stability of egg lipids. 2012. 155p. Thesis (Doctoral degree) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2012.

ABSTRACT

Egg is consumed *in natura* or processed and is used as raw material in various food products. The pasteurization and spray-drying processes are the main processing applied to the egg. Different processing conditions, packaging and storage can affect the lipid oxidative stability and may reduce the natural antioxidant protection of this product. The use of packages in which the egg has no contact with light and oxygen, storage at low temperatures, and the use of antioxidants can prevent lipid oxidation. Currently, synthetic antioxidants have been increasingly replaced by natural antioxidants or an association between synthetic and natural antioxidants is adopted by food companies. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and green tea (*Camellia sinensis* L) are among the vegetables that present the highest antioxidant potential. Based on the above-mentioned considerations, the objectives of this research were: a) To standardize the method of phosphomolybdenum to evaluate the total antioxidant capacity of lipid fraction (CATL) egg; b)To investigate the effect of pasteurization and spray-drying on the antioxidant capacity and oxidative stability of the lipid fraction of egg; c) To assess the oxidative stability of fatty acids and the antioxidant capacity of whole egg subjected to pasteurization followed by spray-drying, stored at 5ºC for 90 days, d) To evaluate the by testing the concentration of antioxidants, oxidative stability of the lipid fraction of egg subjected to pasteurization and spray drying, added with a mixture of rosemary and green tea extracts and BHA (butylated hydroxyanisole); e) To optimize the concentration of the mixture composed of rosemary and green tea extracts and BHA to be added to pasteurized liquid egg (and further subjected to spray-drying) by using Response Surface Methodology; f) To investigate the effect of the addition of this optimized mixture of antioxidants on of the lipid fraction of spray-dried egg, stored at temperatures of 5 and 25°C for 90 days. The phosphomolybdenum method CATL of egg presented analytical suitability once it presented a high coefficient of determination (R^2 = 0,9931), a regression equation expressed as y = 13.705 + 0.0808 x, a limit of detection of 0.005 mg α-tocopherol/mL, a limit of quantitation of 0.017 mg α-tocopherol/mL, a significant and high correlation coefficient (r = 0.9965), and the accuracy did not indicate dispersion around the mean. The CATL decreased with the progress of processing and the reverse was observed for the lipids, 7-CETO (7-ketocholesterol) and TBARS (thiobarbituric acid reactive substances). The pasteurized spray-dried egg (OIPA), which was kept under ideal storage conditions, remained stable in relation to moisture content, CATL and TBARS. In order to test the concentration of antioxidants to be added to OIPA, a total of 10 mixtures (rosemary, green tea and BHA) were assayed. The addition of antioxidants resulted in a higher oxidative stability of the lipid fraction as measured by TBARS, CATL, CT-F (reduction capacity by using the Folin-Ciocalteau reagent), AGL (free fat acids) and AS-233 (substances that absorb at 233 nm). The results showed that the response surface methodology (RSM) was adequate to describe the development of free fat acids and AS-233 in OIPA, and the RSM model proposed for AS-233 can be used for prediction purposes. The optimization of the antioxidant mixture based on the mathematical model proposed

for AS-233 indicated that the mixture of 150ppm of BHA, 600ppm of rosemary extract and 300ppm of green tea extract was the best combination of antioxidants. The adopted storage conditions and the addition of antioxidants to OIPA were effective to maintain the response variables stable, and the stability was higher when OIPA was stored at 5°C. It was concluded that the method of phosphomolybdenum suitability presented analytically. The pasteurization did not affect the analyzed parameters (lipids, TBARS, CATL and 7-CETO), but the spray-drying caused a significant decrease CATL, and an increase in lipids, TBARS and 7-CETO. The hydration and the oxidative stability of OIPA remained stable for 90 days at 5°C, indicating that the packaging and storage conditions were effective. The RSM models proposed for free fat acids and AS-233 could be used for predictive purposes; however, the optimization procedure was performed taken into account only the AS-233 model. The OIPA stored at 5°C for 90 days, with or without the addition of the antioxidant mixture, was more stable in relation to hydration and lipid oxidation.

Keywords: egg pasteurization, spray-drying, rosemary extract, green tea extract, BHA, packaging under nitrogen gas, storage and lipid oxidation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Umidade, valor energético e composição de química do ovo de galinha integral cru e em pó, por 100 gramas de parte comestível..... 27

Tabela 2. Requisitos de tempo/temperatura para pasteurização de produtos líquidos de ovo segundo a legislação brasileira..... 38

Tabela 3. Delineamento experimental adotado..... 65

Tabela 4. Níveis das variáveis independentes a serem testadas..... 65

Tabela 5. Laudo técnico do Guardian™ Rosemary Extract 08 – DANISCO 66

Tabela 6. Laudo técnico do Guardian™ Green Tea Extract 20M – DANISCO 66

Tabela 7. Lipídio (LP), capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e 7-cetocolesterol (7-CETO) em ovo líquido integral (OLI), ovo líquido integral pasteurizado (OLIP) e ovo integral pasteurizado atomizado (OIPA)..... 81

Tabela 8. Umidade (U), capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do ovo integral pasteurizado atomizado mantido estocado em frasco de plástico, sob atmosfera de nitrogênio, ao abrigo da luz e a 5±2ºC, analisado por até 90 dias..... 85

Tabela 9. Efeitos da adição e concentração das misturas de antioxidantes (Alecrim/ Chá verde/BHA/) ao ovo integral pasteurizado atomizado avaliados pela capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), capacidade redutora pelo reativo de Folin - Ciocalteau (CR-F), ácidos graxos livres (AGL) e substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233)..... 92

Tabela 10. Análises de regressão referentes à capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a capacidade redutora pelo reativo de Folin – Ciocalteau (CR-F), aos ácidos graxos livres (AGL) e as substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233)..... 96

Tabela 11. Umidade (U), capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) e 7-cetocolesterol (7-CETO) do ovo integral pasteurizado atomizado sem antioxidantes (controle) e com a mistura de antioxidantes otimizada (AA), estocado por até 90 dias em embalagem impermeável ao oxigênio, sob atmosfera de nitrogênio, ao abrigo da luz a 5±2ºC..... 106

Tabela 12. Umidade (U), capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) e 7-cetocolesterol (7-CETO) do ovo integral pasteurizado atomizado sem antioxidantes (controle) e com a mistura de antioxidantes otimizada (AA), estocado por até 90 dias em embalagem impermeável ao oxigênio, sob atmosfera de nitrogênio, ao abrigo da luz a 25±2ºC..... 108

Tabela 13. Umidade (U), capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) e 7-cetocolesterol (7-CETO) do ovo integral pasteurizado atomizado sem antioxidantes (controle) estocado por 90 dias em embalagem impermeável ao oxigênio, sob atmosfera de nitrogênio, ao abrigo da luz, a 5 ±2ºC e a 25±2ºC..... 110

Tabela 14. Umidade (U), capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) e 7-cetocolesterol (7-CETO) do ovo integral pasteurizado atomizado com a mistura de antioxidantes otimizada (AA), estocado por até 90 dias em embalagem impermeável ao oxigênio, sob atmosfera de nitrogênio, ao abrigo da luz, a 5 ±2°C e a 25±2ºC..... 112

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Resíduos da curva de calibração da CATL..... 79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Molécula de colesterol..... 29

Figura 2. Molécula de 7-cetocolesterol..... 31

Figura 3. Molécula de 7α-hidroxicolesterol..... 32

Figura 4. Molécula de 7β-hidroxicolesterol..... 32

Figura 5. Molécula de 20-hidroxicolesterol..... 32

Figura 6. Molécula de 25-hidroxicolesterol..... 32

Figura 7. Molécula de colesterol-5α,6α–epóxido..... 33

Figura 8. Molécula de colesterol-5β,6β–epóxido..... 33

Figura 9. Molécula de colestanotriol..... 33

Figura 10. Esquema do *Mini Spray Dryer* B-290 e do fluxo do ar de secagem..... 62

Figura 11. Correlação entre a capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) (equivalente em mg de α-tocoferol/ g) e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (mg de dialdeído malônico/Kg) observada no ovo integral pasteurizado atomizado (OIPA) durante a estocagem por até 90 dias..... 86

Figura 12. Superfície de resposta da capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) (equivalente em mg de α-tocoferol/g) do ovo integral pasteurizado atomizado, em função da concentração adicionada de alecrim e chá verde..... 98

Figura 13. Superfície de resposta dos ácidos graxos livres (AGL: % ácido oléico/g lipídio) do ovo integral pasteurizado atomizado, em função da concentração adicionada de chá verde e BHA..... 99

Figura 14. Superfície de resposta dos ácidos graxos livres (AGL: % ácido oléico/g lipídio) do ovo integral pasteurizado atomizado, em função da concentração adicionada de alecrim e BHA..... 100

Figura 15. Superfície de resposta das substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) (equivalente em µg 7-cetocolesterol/ mg lipídio) do ovo integral pasteurizado atomizado, em função da concentração adicionada de alecrim e BHA 101

Figura 16. Correlação entre a capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) (equivalente em mg de α-tocoferol/ g) e o tempo de estocagem a 5±2°C do ovo integral pasteurizado atomizado adicionado de antioxidantes..... 114

Figura 17. Correlação entre o 7-cetocolesterol (µg 7-cetocolesterol/ mg lipídio) e o tempo de estocagem a 5±2°C do ovo integral pasteurizado atomizado adicionado de antioxidantes..... 115

Figura 18. Correlação entre o 7-cetocolesterol (µg 7-cetocolesterol/ mg lipídio) e o tempo de estocagem a 25±2°C do ovo integral pasteurizado atomizado adicionado de antioxidantes..... 116

Figura 19. Correlação entre as substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) (equivalente em µg 7-cetocolesterol/ mg lipídio) e o tempo de estocagem a 25±2°C do ovo integral pasteurizado atomizado sem adição de antioxidantes..... 117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHA	Butilato de hidroxianisol (butylated hidroxyanisole)
BHT	Butilato de hidroxitolueno (butylated hidroxytoluene)
OsC	Óxidos de colesterol
7α-OOH	7α-colesterol-hidroperóxido
7β-OOH	7β-colesterol-hidroperóxido
25-OOH	25-hidroperóxido
7-CETO	7-cetocolesterol
7α-OH	7α-hidroxicolesterol
7β-OH	7β-hidroxicolesterol
20-OH	20-hidroxicolesterol
25-OH	25-hidroxicolesterol
5α,6α–epoxi	Colesterol-5α,6α–epóxido
5β,6β–epoxi	Colesterol-5β,6β–epóxido
Triol	Colestanotriol
Psi	Libras por polegada quadrada
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
DPPH	2,2-difenil-picrilhidrazila
TBHQ	*terc*-butil hidroquinona
PG	Galato de propila
EC	Epicatequina
ECG	Epicatequina galate
EGC	Epigalocatequina
EGCG	Epigalocatequina galate
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Guardian™ Green Tea Extract 20M	Extrato de chá verde
Guardian™ Rosemary Extract 08	Extrato de alecrim
CATL	Capacidade antioxidante total da fração lipídica

RSM	Metodologia de superfície de resposta
AGL	Ácidos graxos livres
CR-F	Capacidade redutora pelo reativo de Folin-Ciocalteau
AS-233	Substâncias absorvidas a 233 nm
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
DP	Desvio-padrão
CV	Coeficiente de variação
Mo	Molibdato

SUMÁRIO

1.	**INTRODUÇÃO**.....	21
2.	**REVISÃO DA LITERATURA**.....	25
2.1	OVO.....	25
2.1.1.	Produção e consumo.....	25
2.1.2.	Aspectos nutricionais.....	26
2.2.	COLESTEROL E ÓXIDOS DE COLESTEROL.....	28
2.2.1.	Colesterol.....	28
2.2.2.	Óxidos de colesterol.....	29
2.3.	PROCESSAMENTO DO OVO.....	35
2.3.1.	Ovo líquido integral.....	36
2.3.2.	Pasteurização.....	37
2.3.3.	Atomização.....	39
2.4.	EFEITO DA ATOMIZAÇÃO E DA ESTOCAGEM.....	41
2.5.	ANTIOXIDANTES.....	45
2.5.1.	Antioxidantes sintéticos.....	47
2.5.2.	Antioxidantes naturais.....	48
2.5.2.1.	Alecrim.....	49
2.5.2.2.	Chá verde.....	50
2.5.3.	USO DE ANTIOXIDANTES.....	52
2.5.3.1.	Suplementação em dietas de aves.....	52
2.5.3.2.	Ovo e produtos derivados.....	54
2.6.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	56
2.6.1.	Ensaio de redução do complexo de fosfomolibdênio.....	56
3.	**OBJETIVO**.....	58
3.1.	Objetivo geral.....	58
3.2.	Objetivos específicos.....	58
4.	**MATERIAL E MÉTODOS**.....	60
4.1.	Material.....	60

4.1.1. Reagentes..... 60

4.1.2. Amostras..... 61

4.2. Métodos..... 61

4.2.1. Obtenção do ovo líquido integral..... 61

4.2.2. Pasteurização do ovo líquido integral..... 62

4.2.3. Atomização do ovo líquido integral pasteurizado..... 62

4.2.4. Estudo da capacidade antioxidante e da estabilidade oxidativa lipídica do ovo líquido integral, do ovo líquido integral pasteurizado e do ovo integral pasteurizado atomizado obtido em laboratório..... 63

4.2.4.1. Efeito da pasteurização e atomização sobre o ovo líquido integral..... 63

4.2.4.2. Efeito da estocagem sobre o ovo integral pasteurizado atomizado..... 64

4.2.4.3. Efeitos da adição e concentração da mistura de antioxidantes (extrato de alecrim, extrato de chá verde e BHA) sobre a estabilidade oxidativa lipídica do ovo integral pasteurizado atomizado..... 64

4.2.4.4. Otimização das concentrações da mistura de antioxidantes (extrato de alecrim, extrato de chá verde e BHA) pelo modelo matemático proposto pela metodologia de superfície de resposta..... 67

4.2.4.5. Efeitos da adição da mistura otimizada de antioxidantes (extrato de alecrim, extrato de chá verde e BHA) e das condições de estocagem sobre a estabilidade oxidativa lipídica do ovo integral pasteurizado atomizado..... 67

4.2.5. Quantificações analíticas..... 68

4.2.5.1. Umidade..... 68

4.2.5.2. Lipídios totais..... 68

4.2.5.3. Quantificação dos óxidos de colesterol livres..... 68

4.2.5.4. Quantificação das substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233)..... 69

4.2.5.5. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)..... 70

4.2.5.6. Ácidos graxos livres (AGL)..... 70

4.2.5.7. Capacidade redutora pelo reativo de Folin-Ciocalteau (CR-F) - Fenólicos totais..... 71

4.2.5.8. Capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL)..... 71

4.2.5.8.1. Extração..... 72

4.2.5.8.2. Preparo do reativo de fosfomolibdato..... 72

4.2.5.8.3. Procedimento..... 73

4.2.5.9. Padronização do método do fosfomolibdênio para avaliação da capacidade antioxidativa total da fração lipídica (CATL)..... 73

4.2.5.9.1. Linearidade da curva de calibração..... 73

4.2.5.9.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)..... 74

4.2.5.9.3. Precisão..... 74

4.2.5.9.4. Recuperação (R)..... 75

4.3. Análise estatística dos dados..... 75

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 78

5.1. Padronização do método do fosfomolibdênio para avaliação da capacidade antioxidante total da fração lipídica do ovo..... 78

5.2. Efeitos da pasteurização e da atomização sobre a capacidade antioxidante e a estabilidade oxidativa da fração lipídica do ovo..... 81

5.3. Efeito da estocagem sobre a estabilidade oxidativa dos ácidos graxos e a capacidade antioxidante do ovo integral pasteurizado atomizado..... 85

5.4. Efeitos da adição e concentração da mistura de antioxidantes sobre a estabilidade oxidativa lipídica do ovo integral pasteurizado atomizado..... 90

5.5. Otimização das concentrações de antioxidantes pelo modelo matemático proposto pela metodologia de superfície de resposta..... 103

5.6. Efeitos da adição de antioxidantes e das condições de estocagem sobre a estabilidade oxidativa lipídica do ovo integral pasteurizado atomizado..... 105

6. CONCLUSÕES..... 120

7. REFERÊNCIAS..... 123

ANEXOS..... 149

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a sétima posição mundial na produção de ovos de galinha, atrás da China, Estados Unidos, México e Japão. A produção brasileira de ovos em 2010 foi de 2,460 bilhões de dúzias, aumento de 4,2% sobre o ano de 2009. O preço médio anual da dúzia do produto variou de R$ 1,67 em 2009 a R$ 1,77 em 2010. O consumo interno *per capita* gira em torno de 16 dúzias/habitante/ano.

O ovo é fonte de proteína de alta qualidade, com elevada concentração de aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais, lipídios e colesterol. O ovo tem sido amplamente consumido na sua forma *in natura* ou como matéria-prima extensamente submetida a diversos tipos de processamento para obtenção de vários produtos.

A pasteurização e a atomização são os principais processamentos aplicados ao ovo. Ambos visam obter produtos mais seguros microbiologicamente e com vida de prateleira prolongada. Entretanto, destaca-se o ovo atomizado, se comparado ao ovo em casca ou ovo líquido, tem reduzido volume e uma vida útil maior.

A desidratação por atomização (*spray drying)* é o processo no qual um líquido, de baixa ou alta viscosidade, mesmo quando quase pastoso, é transformado em um produto desidratado e pulverizado em uma única operação, caracterizando-se pelo tempo de realização relativamente curto.

O ovo por ser um alimento rico em colesterol e ácidos graxos insaturados, torna-se susceptível à oxidação, principalmente quando submetido às altas temperaturas empregadas durante a atomização. Assim, podem ocorrer modificações químicas, como a oxidação lipídica, e escurecimento não enzimático com formação de compostos indesejáveis. Além da alta temperatura, fatores como área de exposição superficial elevada e a presença de oxigênio, promovem à auto-oxidação lipídica durante a atomização. Com isso, a proteção natural conferida ao ovo por carotenóides, tocoferóis, fosfolipídios e lipoproteínas é significativamente reduzida.

O controle da estabilidade oxidativa lipídica é necessário para prevenir a perda nutricional, o comprometimento de atributos sensoriais e a produção de compostos tóxicos, como dialdeído malônico (iniciador de processo cancerígeno e mutagênico), a partir de ácidos graxos, e óxidos de colesterol (citotóxicos, angiotóxicos, aterogênicos, mutagênicos e carcinogênicos). A prevenção ou redução da oxidação lipídica no ovo atomizado pode ser possível por meio de condições adequadas de estocagem, com ausência de luz e de oxigênio, temperatura baixa, além do uso de antioxidantes.

Vários produtos vegetais possuidores de atividade antioxidante têm sido cogitados na substituição de antioxidantes sintéticos convencionais, associados ou não entre si. O objetivo é diminuir a quantidade de antioxidantes sintéticos nos alimentos, devido aos efeitos maléficos (alergia e doenças degenerativas) evidenciados aos organismos. Entretanto, a substituição dos antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais dependerá, entre outros fatores, da determinação de uma concentração ideal.

É crescente na indústria de alimentos a utilização de extratos de plantas com capacidade antioxidante, como o de alecrim e de chá verde, oferecendo capacidade antioxidativa natural para uso em alimentos, decorrendo essa habilidade do elevado teor de compostos fenólicos presentes.

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), membro da família *Labiatae,* tem sido utilizado por suas propriedades medicinais e, em sistemas lipídicos, é reconhecido como agente antioxidante com maior potencialidade de uso entre os demais. É fonte de compostos fenólicos que desempenham atividade antioxidante como carnosol, rosmanol, rosmaridifenol e rosmariquinona.

O chá verde *(Camellia sinensis L.),* planta da família *Theaceae*, também conhecido popularmente por chá da índia ou *green tea* , é a bebida não alcoólica mais consumida no mundo, depois da água. Suas folhas são fonte de polifenólicos, que incluem flavanóis (predominam as catequinas), flavandióis, flavonóides e ácidos fenólicos, que totalizam cerca de 30% do peso seco das folhas, cuja principal propriedade terapêutica é a de antioxidante.

Sendo inevitável o uso não totalmente seguro de antioxidantes sintéticos, como vem ocorrendo com o BHA (butilato de hidroxianisol) e BHT (butilato de hidroxitolueno), para impedir as consequências provocadas pela oxidação lipídica em alimentos, torna-se importante substituí-los, ainda que parcialmente, por antioxidantes naturais, que sejam seguros, e cuja ação possa no mínimo ser semelhante.

No presente trabalho foi verificada a influência do processamento, estocagem e aplicação da mistura de extratos de antioxidantes naturais (alecrim e chá verde) e sintético (BHA), em relação à estabilidade oxidativa do ovo.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. OVO

2.1.1. Produção e consumo

O Brasil é o sétimo maior produtor mundial de ovos de galinha, atrás da China, Estados Unidos, México e Japão (UBA, 2010; STEFANELLO, 2011). A produção brasileira de ovos de galinha no 4º trimestre de 2010 foi de 621,547 milhões de dúzias, com aumento de 3,4% em relação ao mesmo período de 2009.

Em 2010, a região Norte teve queda de 27,6% da produção de ovos de galinha. O maior estado produtor, o Amazonas, registrou redução de 37,7%. Por outro lado, a região Centro-Oeste teve aumento da produção de 11,9%, impactado pela elevação de 29,4% ocorrido no Mato Grosso. A região Sudeste deteve 49,0% de toda a produção nacional de ovos de galinha, tendo em São Paulo o principal produtor com 30,2% de participação. O Sul do Brasil participou com 22,6% de todo o volume nacional (IBGE, 2012a).

O preço médio anual em 2009 da dúzia do produto variou de R$ 1,67 a R$ 1,77 em 2010. Em 2010, o consumo interno *per capita* girou em torno de 16 dúzias/habitante/ano (IBGE, 2012b). A maior parte da produção brasileira de ovos é comercializada no mercado interno, mas adequações no setor têm ocorrido nos últimos anos com a finalidade de incrementar as exportações. Entretanto, para atender as exigências do consumidor nacional e do mercado internacional existe a necessidade da contínua implementação de programas que garantam o elevado padrão de qualidade dos ovos (STEFANELLO, 2011).

Os ovos são produtos de fácil acesso para população, devido o baixo custo quando considerado o seu elevado valor nutricional, sendo um ingrediente de alta importância na culinária brasileira e muito útil na indústria de alimentos (LOT et al., 2005). Para Pascoal et al. (2008), os ovos são importantes constituintes da

alimentação humana, podendo contribuir, principalmente, para melhorar a dieta de pessoas de baixa renda.

A produção de ovos no Brasil caracteriza-se pelo consumo *in natura* e industrializado. A ideia central deste sistema de produção é o da complementação da produção rural no fornecimento de matéria-prima para a atividade industrial (DONATO et al., 2009).

2.1.2. Aspectos nutricionais

O ovo é um alimento multifuncional, devido suas propriedades espumantes, coagulantes, emulsificantes e adesivas. É uma matéria-prima extensamente utilizada na fabricação de maionese, massas, molhos, produtos de panificação e confeitaria (KITAHARA, 2004; OHATA; VIOTTO, 2011).

O ovo apresenta proteína de alta qualidade, com elevada concentração de aminoácidos essenciais, além de ser fonte de vitaminas A, B_2, B_{12} e D, e de minerais, como ferro, manganês, zinco, fósforo, magnésio e é livre de ácidos graxos trans (SURAI; SPARKS, 2001; CABONI et al., 2005; FRONING, 2008; SARTORI et al., 2009). Apenas um único ovo supre aproximadamente 10% da ingestão recomendada para adultos, de vitamina A e de ácido fólico, e 17% da recomendação de vitamina B_{12} (SATORI et al., 2009). Dentre seus componentes, constam altas quantidades de lipídios (triacilgliceróis e fosfolipídios) e colesterol (WATKINS, 1995; NIELSEN, 2007), assim como, os carotenóides (beta-caroteno) e a vitamina E (WATSON, 2002; KANG et al., 2003; WENZEL; SEUSS –BAUM; SCHLICH, 2010).

A casca representa 12% da composição do ovo, sendo formada basicamente de camadas de cristais de carbonato de cálcio. A clara (albúmen) representa 56%. É constituída por mais de 13 proteínas, sendo a ovoalbumina e ovotransferrina as principais (66% da proteína total da clara). A gema compõe 28-32% do ovo, consiste principalmente de lípidio (63%, base seca), seguido de proteína e carboidratos (KIM; CHOE, 2008), além de conter a maior fração de nutrientes essenciais, como vitaminas, fosfolipídios, ácidos graxos essenciais e minerais (BERTECHINI, 2003). Na Tabela 1 são encontrados a umidade, o valor

energético e a composição química do ovo de galinha integral cru e em pó, por 100 gramas de parte comestível.

Tabela 1. Umidade, valor energético e composição química do ovo de galinha integral cru e em pó, por 100 gramas de parte comestível

Componentes	Ovo integral cru	Ovo em pó
Umidade (g)	71,94	4,00
Energia (Kcal)	166	554
Carboidrato (g)	1,42	9,00
Proteína (g)	13,86	44,00
Cinzas (g)	1,12	5,00
Lipídios totais (g)	11,66	38,00

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP (2011)

O ovo por sua alta concentração de colesterol é muito associado a doenças cardiovasculares (SIM, 1998; GOMES; BORGES, 2001). No entanto, estudos prévios indicaram que o colesterol na dieta não é fator de incidência de doenças cardiovasculares. Além disso, há pouca evidência de que a ingestão de ovos faz com que aumente os lipídios no sangue ou os níveis de frações do colesterol, consideradas maléficas à saúde (LDL, lipoproteína de baixa densidade) (BRANDÃO et al., 2005; JUNG et al., 2011).

Por outro lado, os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) presentes na gema de ovo são considerados nutrientes substanciais para prevenir doenças cardiovasculares e crônicas (RUSSO, 2009; JUNG et al., 2011). A literatura indica que o ovo líquido integral apresenta em média 35,2% de ácidos graxos saturados, 45,8% de monoinsaturados e 18,9% de poli-insaturados (CHERIAN; HOLSONBAKE; GOEGER, 2002; KITAHARA, 2004). Sendo o ácido oléico e ácido linoléico os principais ácidos graxos insaturados (HUR; PARK; JOO, 2007).

2.2. COLESTEROL E ÓXIDOS DE COLESTEROL

2.2.1. Colesterol

O colesterol (cholest-5-en-3β-ol) é um álcool esteróide componente essencial da estrutura das biomembranas, que está intimamente associada com os fosfolipídios (VALENZUELA; SANHUEZA; NIETO, 2003). É um composto lipídico insaturado, insolúvel em água, instável e susceptível à oxidação, sendo seu processo oxidativo influenciado por muitos fatores (BÖSINGER; LUF; BRANDL, 1993; MORALES-AIZPURÚA; TENUTA-FILHO, 2002; ROJAS et al., 2007; HUR; PARK; JOO, 2007).

O colesterol (Figura 1) apresenta uma dupla ligação entre os carbonos 5 e 6 do anel B, que o torna susceptível à oxidação (BUSCH; KING, 2009; DEREWIAKA; OBIEDZINSKI, 2010). Tem como estrutura básica o núcleo ciclopentano-per-hidro-fenantreno, formado por quatro anéis condensados de hidrocarboneto (A-D), com caráter apolar, insolúvel em água, e uma cadeia lateral ramificada de hidrocarboneto unida ao carbono 17 do núcleo esteróide, também apolar e insolúvel em água. Há um grupo hidroxila no C-3, do anel A, em configuração beta, de caráter polar, que confere alguma afinidade com o meio aquoso e capacidade de esterificação com ácidos graxos, convertendo-se, neste caso, em totalmente insolúvel (MAERKER, 1987; OLIVEIRA; QUINTÃO, 1992; GUARDIOLA et al.; 1995; MOREL; LIN, 1996; SMITH, 1996; MORALES-AIZPURÚA; TENUTA-FILHO, 2002; GUARDIOLA et al., 2002; HUR; PARK; JOO, 2007). O organismo humano obtém o colesterol pela biossíntese no fígado, ovários, testículos e glândulas adrenais, e por meio da dieta (VALENZUELA; SANHUEZA; NIETO, 2003; HUR; PARK; JOO, 2007).

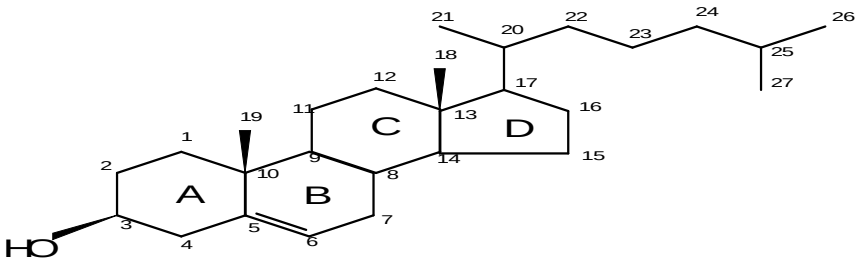


Figura 1. Molécula de colesterol (5-cholesten-3β-ol) (PANIANGVAIT et al., 1995)

Há uma ampla variação na concentração de colesterol encontrada em produtos de ovo é variada, isto é de 237 a 431mg/100g em ovo líquido integral (JIANG; AHN; SIM, 1991; SARANTINOS; O'DEA; MARSIGLIA, 1994; KING, 1995; PIRONEN; TOIVO; LAMPI, 2002; BRAGAGNOLO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2003; KITAHARA, 2004; ESCARABAJAL, 2011), e de 1694 a 2033 mg/ 100g em ovo atomizado (MEDINA, 2009).

2.2.2. Óxidos de colesterol

O colesterol existente nos alimentos está acompanhado de vários outros compostos. A interação desses compostos com o colesterol pode afetar a sua estabilidade oxidativa e a via de sua oxidação (KIM; NAWAR, 1991). A molécula de colesterol pode ser oxidada por via enzimática ou não. Ambos os processos levam à formação de um número apreciável de óxidos de colesterol (OsC) e de natureza tóxica (GUARDIOLA et al., 1995). Nos seres vivos, os OsC são formados por via enzimática, basicamente no fígado e nos tecidos geradores de hormônios esteróides (córtex supra-renal, gônadas) (SMITH, 1996). Nos alimentos, a oxidação ocorre por mecanismos não-enzimáticos, comumente conhecidos como autoxidação, peroxidação lipídica e oxidação fotoquímica (GUARDIOLA et al., 1995; MORALES-AIZPURÚA; TENUTA-FILHO, 2002; BUSCH; KING, 2009).

Os óxidos de colesterol produzidos são semelhantes ao colesterol, tendo em comum o núcleo ciclopentano-per-hidro-fenantreno. Os OsC contém um grupo funcional adicional (cetona, ou hidroxila ou epóxido) no núcleo esterol ou na cadeia lateral da molécula (MAERKER, 1987; MOREL; LIN, 1996; SMITH, 1996; CABONI et al., 1997; HUR; PARK; JOO, 2007). As diferenças estruturais e a posição dos grupos funcionais definem o tipo e a intensidade do efeito biológico (CRASTES DE PAULET et al., 1988; PENG; HU; MORIN, 1991; MORALES-AIZPURÚA; TENUTA-FILHO, 2002).

A oxidação de ácidos graxos e de colesterol segue os mesmos padrões como verificados na fotooxidação, na auto-oxidação e na oxidação enzimática, produzindo hidroperóxidos (SMITH, 1981). Acredita-se que os hidroperóxidos derivados da oxidação de ácidos graxos insaturados desempenhem um papel importante, facilitando a oxidação do colesterol na dupla ligação do carbono 5 (LERCKER; RODRIGUEZ-ESTRADA, 2002; HUR; PARK, JOO, 2007; BUSCH; KING, 2009).

A oxidação do colesterol é iniciada pela retirada do hidrogênio predominantemente no carbono 7, formando um radical livre que reage rapidamente com o oxigênio triplete ($^3O_2$) levando à subsequente formação de 7α-colesterol-hidroperóxido (7α-OOH) ou 7β-colesterol-hidroperóxido (7β-OOH), produtos primários da oxidação do colesterol. A posterior desidratação do 7α-OOH e 7β-OOH resulta na formação de 7α-hidroxicolesterol, 7β-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol, produtos secundários da oxidação do colesterol. O 7-cetocolesterol também pode ser formado pela desidrogenação do 7α-hidroxicolesterol e 7β-hidroxicolesterol na presença de radicais. A interação do colesterol com 7α-OOH ou 7β-OOH em presença de peróxido de hidrogênio causa a formação de 5α e 5β-epoxicolesterol, os quais, por sua vez, em meio aquoso, podem resultar na formação de colestanotriol. Assim, estes compostos oxigenados aparentemente são originados da hidroperoxidação de colesterol (MAERKER,1987; HUR; PARK; JOO, 2007). Além disso, a abstração do hidrogênio e formação do radical livre no carbono 7, poderá causar uma transferência de radicais, gerando um radical livre no carbono 25. Este reage com o oxigênio triplete formando o radical peroxila no C-25 e em seguida o

25-hidroperóxido que, por desidratação, resulta no 25-hidroxicolesterol (MAERKER,1987; SMITH, 1987; KITAHARA, 2004).

São múltiplos os fatores que influenciam a formação de óxidos de colesterol em alimentos (MORALES-AIZPURÚA, TENUTA-FILHO, 2002; ROJAS et al., 2007). Além da presença de oxigênio e atividade de água, influem a temperatura, radiações, agentes fotossensibilizantes, íons metálicos de transição, tempo de armazenamento, pH e a concentração do colesterol (CSALLANY et al., 1989, SANDER et al.,1989a; WASOWICZ et al., 2004; ROJAS et al., 2007).

Há mais de uma década, a literatura já mostrava que mais de 80 produtos da oxidação do colesterol haviam sido identificados (TAI; CHEN; CHEN, 1999). Mas um número bem menor, corresponde aos OsC mais frequentemente detectados em alimentos e produtos derivados, como o 7-cetocolesterol (7-CETO), 7α-hidroxicolesterol (7α-OH), 7β-hidroxicolesterol (7β-OH), 20-hidroxicolesterol (20-OH), 25-hidroxicolesterol (25-OH), colesterol-5α,6α–epóxido (5α,6α–epoxi), colesterol-5β,6β–epóxido (5β,6β–epoxi) e colestanotriol (triol) (ADDIS et al., 1996; SMITH; JOHNSON, 1989) (Figuras 2-9). O 7-CETO é o que se apresenta em maior concentração (PIE; SPAHIS; SEILLAN, 1991; OSADA et al., 1993), em oposição ao 25-OH (GUARDIOLA et al., 1995), variando o conteúdo de acordo com o tipo de alimento (LERCKER; RODRÍGUES-ESTRADA, 2000). O 25-OH juntamente com o triol, são considerados os OsC mais aterogênicos (PENG; HU; MORIN, 1991; ADDIS et al., 1996).

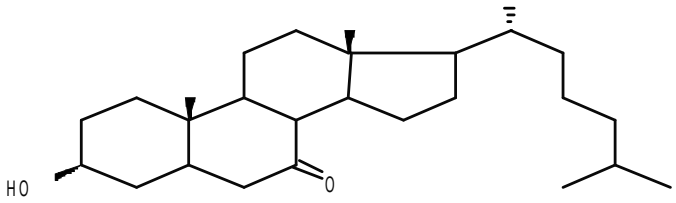


Figura 2. Molécula de 7-cetocolesterol (3β-hydroxycholest-5-en-7-one)

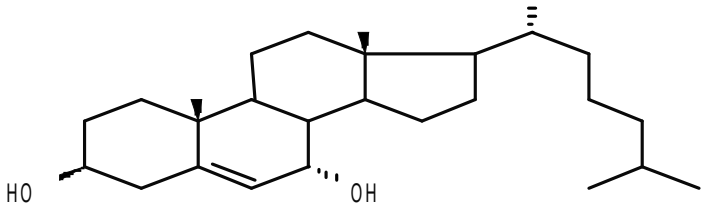


Figura 3. Molécula de 7α-hidroxicolesterol (cholest-5-en-3β,7α-diol)

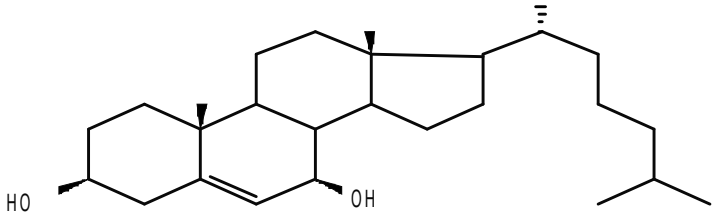


Figura 4. Molécula de 7β-hidroxicolesterol (cholest-5-en-3β,7β-diol)

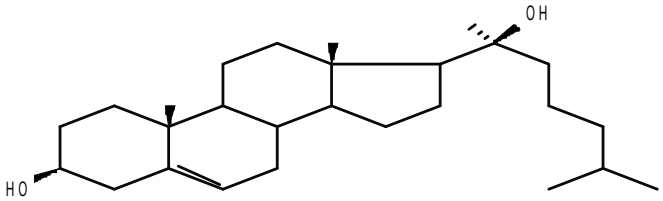


Figura 5. Molécula de 20-hidroxicolesterol (cholest-5-en-3β,20-diol)

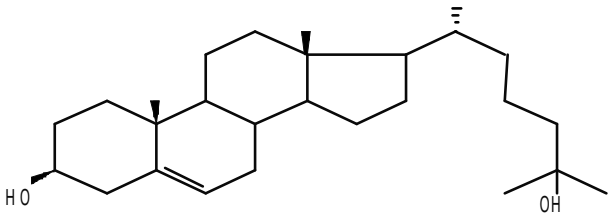


Figura 6. Molécula de 25-hidroxicolesterol (cholest-5-en-3β,25-diol)

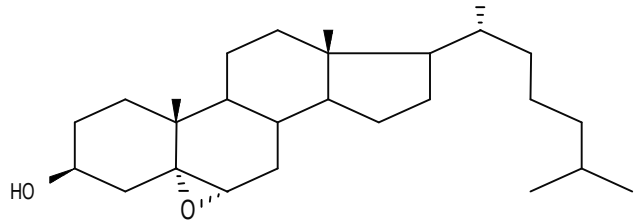


Figura 7. Molécula de colesterol-5α,6α–epóxido (5,6 α-epoxy-5α-cholestan-3β-ol)

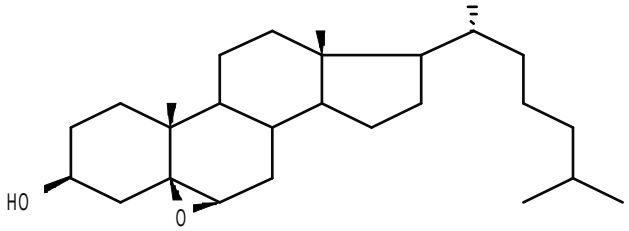


Figura 8. Molécula de colesterol-5β,6β–epóxido (5,6 β-epoxy-5β-cholestan-3β-ol)

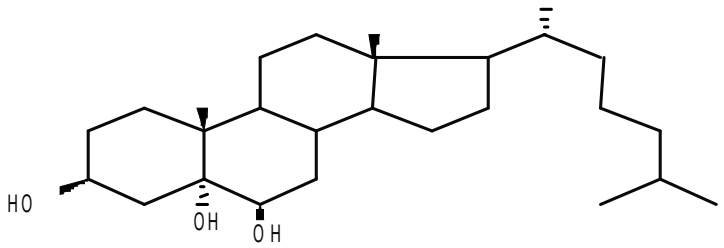


Figura 9. Molécula de colestanotriol (5α-cholesten-3β,5,6β-triol)

Os OsC são encontrados em alimentos de origem animal, em função do colesterol (BOSINGER; BRANDL, 1993). A presença de OsC em alimentos tem sido observada, destacando-se aqueles com maior conteúdo de colesterol, em ordem decrescente, os produtos de ovos (NABER; BIGGERT, 1985; PIE; SPAHIS; SEILLAN, 1990; SARANTINOS; O'DEA; SINCLAIR, 1993; ZUNIN et al., 1995;

MORALES-AIZPURÚA, 2001; KITAHARA, 2004; MEDINA, 2009; ESCARABAJAL, 2011), cárneos (CSALLANY et al., 1989; PIE; SPAHIS; SEILLAN, 1991), lácteos (SANDER et al., 1989a; PIE; SPAHIS; SEILLAN, 1990; SARANTINOS; O'DEA; SINCLAIR, 1993) e marinhos (OSADA et al., 1993; MOURA, 1999). As características do alimento e as interações entre seus componentes e dos seus produtos de decomposição, durante o processamento e/ou estocagem, definem o perfil dos óxidos formados e as quantidades correspondentes (MORALES-AIZPURÚA; TENUTA-FILHO, 2002).

Por outro lado, tem sido evidenciado que alimentos frescos de origem animal apresentam apenas traços de OsC, ou simplesmente não apresentam tais compostos (TSAI; HUDSON, 1984; SANDER et al., 1989b; PIE; SPAHIS; SEILLAN, 1991; SARANTINOS; O'DEA; SINCLAIR, 1993; GUARDIOLA et al., 1995; MORALES-AIZPURÚA; TENUTA-FILHO, 2002). É importante destacar que há heterogeneidade nas metodologias analíticas aplicadas nos diversos estudos publicados o que conduz à variabilidade de resultados (GUARDIOLA et al., 1995). A falta de uma metodologia analítica, padronizada, oficial, capaz de quantificar níveis baixos de OsC e acessível a um grande número de laboratórios, impede que resultados de pesquisa possam ser comparáveis (DUTTA et al. 1999; GUARDIOLA; BOATELLA; CODONY, 2002; ULBERTH; BUCHGRABER, 2002; DUTTA; SAVAGE, 2002; GUARDIOLA et al., 2004; DUTTA, 2004).

OsC podem ser absorvidos pelos animais (OSADA; SASAKI, 1994) e pelo homem (LINSEISEN; WOLFRAM, 1998), através do intestino delgado, e transportados pelas lipoproteínas exógenas e quilomícrons (PENG; HU; MORIN, 1991; OSADA; SASAKI, 1994; VINE et al., 1997). Os OsC encontram-se distribuídos em células e tecidos, nos quais o metabolismo e propriedades físico-químicas podem alterar seus efeitos biológicos (CRASTES DE PAULET et al.,1988; LINSEISEN; WOLFRAM, 1998). Há consenso no sentido de se considerar o catabolismo dos OsC similar ao do colesterol, por meio do qual os óxidos podem ser rápida e eficientemente metabolizados e eliminados do organismo, através da secreção biliar e excreção fecal (LINSEISEN; WOLFRAM, 1998). A avaliação toxicológica dos óxidos de colesterol depende de sua biodisponibilidade motivada pela absorção variada entre os óxidos de colesterol.

OsC são substâncias que estão relacionadas com a iniciação e propagação de vários doenças, como câncer, aterosclerose e problemas cardiovasculares (ROJAS et al., 2007), a processos citotóxicos, angiotóxicos e mutagênicos (BOSINGER; BRANDL, 1993; DEREWIAKA; OBIEDZINSKI, 2010) e a doenças degenerativas como Parkinson, Alzheimer e diabetes (IMAO et al., 1998; HINO et al., 1998; MAZALLI; BRAGAGNOLO, 2007). Além disso, inibem a biossíntese de colesterol e sua absorção na dieta (HUR, PARK; JOO, 2007). Portanto, a ocorrência de OsC verificada em alimentos é de particular importância, sendo que a oxidação do colesterol deve ser evitada (MORALES-AIZPURÚA; TENUTA-FILHO, 2002). Os óxidos comumente encontrados em alimentos, como o 7-CETO, 25-OH, 7α-OH, 7β-OH, 5,6α-epóxido, 5,6β-epóxido e triol, são citotóxicos e aterogênicos, em diferentes graus (BOSINGER; BRANDL, 1993; DEREWIAKA; OBIEDZINSKI, 2010), sendo que o colesterol, por si só, apresenta pequeno efeito citotóxico e aterogênico (IMAI et al., 1976, 1980; PENG; HU; MORIN, 1991).

A ocorrência de OsC exógenos verificada em alimentos é de particular importância, na medida em que seriam somados aos OsC endógenos, normalmente produzidos pelo organismo. Por esta razão, a oxidação do colesterol em alimentos durante o processamento e a estocagem, deve ser evitada ou reduzida a um mínimo aceitável (MORALES-AIZPURÚA; TENUTA- FILHO, 2002).

2.3. PROCESSAMENTO DO OVO

O ovo é consumido diretamente como alimento, na sua forma *in natura*, e/ou indiretamente, como ingrediente participando da formulação de outros produtos alimentares, depois de processados (TAI; CHEN; CHEN, 2000; OHATA; VIOTTO, 2011). Os principais processamentos industriais utilizados em ovo são a pasteurização e a atomização (KITAHARA, 2004).

2.3.1. Ovo líquido integral

O processo de fabricação do ovo líquido integral inclui uma série de etapas. Inicia-se pelo recebimento dos ovos e lavagem antes da quebra, de modo a evitar a contaminação do produto por microrganismos presentes na casca. A lavagem é feita com máquinas adequadas e com água clorada. Segundo Froning (2008), a temperatura da água de lavagem deve estar entre 11°C e 32°C, e esta deve ser trocada a cada 4 horas, para manter as condições sanitárias ideais.

Após a lavagem, os ovos são submetidos à ovoscopia, operação que consiste na verificação da qualidade interna, através da passagem de luz (transiluminação). Nesta operação retiram-se os ovos sujos, trincados, com manchas de sangue e impróprios. Após a ovoscopia os ovos são sanitizados com água clorada (100 a 200ppm) e secos (sob ar) para prevenir posterior contaminação.

As máquinas utilizadas para quebra dos ovos podem separar a gema da clara, em média 144000 ovos/ hora (FRONING, 2008). A quebra dos ovos é realizada em ambiente separado da sala de lavagem e seleção. Nas máquinas, há inspeção em praticamente 100% dos ovos, feita pelos operadores.

Após a quebra e separação, os ovos são filtrados para remoção das calazas ou chalazas, membranas e fragmentos de casca. Em seguida, é realizado o resfriamento em trocadores de calor (placas) e conduzida a padronização com a mistura da gema e clara, adição de insumos (sal, açúcar, peróxido de hidrogênio, ácido cítrico, fosfato monossódico, dióxido de silício, alumínio silicato de sódio etc) e ajuste da porcentagem dos sólidos de acordo com as especificações do cliente. O conteúdo médio de sólidos encontrado na clara, na gema e no ovo líquido integral são de 11-12%, 43%, 21,5-25%, respectivamente (FRONING, 2008; SOMAI NORDESTE, 2011; SHINODA, 2011; FARMAOVOS INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE OVOS LTDA, 2011; SOHOVOS, 2011).

2.3.2. Pasteurização

A pasteurização é realizada logo após a etapa de padronização (FRONING, 2008; SOMAI NORDESTE, 2011; SHINODA, 2011, FARMAOVOS INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE OVOS LTDA, 2011; SOHOVOS, 2011). A pasteurização é um tratamento térmico relativamente brando. O alimento é aquecido à temperatura alta, menor que 100°C, para em seguida ser submetido à redução da temperatura. A eficiência da pasteurização depende, antes de tudo, da qualidade da matéria-prima utilizada, uso de temperatura elevada, por um tempo relativamente curto, e o choque térmico, provocado pela brusca redução da temperatura (FELLOWS, 2006). Froning et al. (2002), recomendam que a clara seja pasteurizada a 56,7°C/ 4,5 minutos, com pH ajustado para 9, e a gema a 63,3°C/ 4,5 minutos.

A pasteurização é utilizada para minimizar possíveis riscos à saúde, devido à contaminação por microrganimos patogênicos como a salmonella (CUNNINGHAM, 1994; FELLOWS, 2006; FRONING, 2008). Foi decretado em 1970, que todos os produtos de ovo deveriam ser livres de salmonella por meio da pasteurização adequada (CUNNINGHAM, 1994; FRONING, 2008). Objetiva ainda destruir microrganismos deteriorantes (fungos e leveduras), inativar enzimas e aumentar a vida de prateleira de alimentos, por dias ou vários meses. Apenas pequenas alterações são verificadas nas características sensoriais e no valor nutricional de alimentos pasteurizados (FELLOWS, 2006).

Na legislação brasileira (Tabela 2) a pasteurização dos produtos líquidos de ovo é regulamentada pela Portaria n° 01, de 21 de fevereiro de 1990 “ Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados”, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 1990).

Tabela 2. Requisitos de tempo/temperatura para pasteurização de produtos líquidos de ovo segundo a legislação brasileira.

Produtos Líquidos	Requisitos Mínimos de Temperatura (°C)	Requisitos Mínimos de tempo (Minutos)
Clara de ovo (sem utilização de produtos químicos)	56,7-55,5	3,5-6,0
Ovo integral	60,0	3,5
Mistura como ovo integral (com menos de 2% de ingredientes que não sejam ovos)	61,0	3,5
Ovo integral fortificado e misturas (24-38% de sólidos de ovo, 2-12% de ingredientes que não sejam ovos)	61-62	3,5-6,2
Ovo Integral Salgado (com 2% mais de sal adicionado)	63,5	3,5
Ovo Integral Doce (2-12% de açúcar adicionado)	61,0	3,5
Gema Pura	60,0-61,0	3,5-6,2
Gema Doce (2-12% de açúcar adicionado)	62,0-63,5	3,5-6,2
Gema Salgada (2-12% de sal adicionado)	62,0-63,5	3,5-6,2

Fonte: BRASIL (1990)

Ovo líquido integral pasteurizado, tem prazo de validade de até 15 dias se mantido sob refrigeração, enquanto sob congelamento estende-se em até 6 meses (SOHOVOS, 2011). A pasteurização tem sido utilizada como processamento prévio

à atomização, garantindo a estabilidade necessária do ovo líquido como matéria-prima a ser transformada em ovo em pó (FELLOWS, 2006).

2.3.3. Atomização

A produção de ovo atomizado no Brasil iniciou-se com a empresa SOHOVOS em 1994 (MEDINA, 2009). A atomização é utilizada para desidratar alimentos líquidos, como o leite, café e ovo, sendo também utilizada na industria química e farmacêutica (MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2012).

A desidratação por atomização (*spray-drying*) é um processo contínuo no qual um líquido de baixa ou alta viscosidade, mesmo aqueles quase pastosos, é transformado em produto desidratado e pulverizado em uma única operação, caracterizando-se pelo tempo relativamente curto. Basicamente consiste na atomização do líquido num compartimento que recebe fluxo de ar quente. A rápida evaporação da água permite manter baixa a temperatura das partículas, de maneira que a alta temperatura do ar de desidratação não afete demasiadamente o produto.

O processo está baseado em quatro fases: atomização do líquido; transferência de calor por contato direto entre o líquido atomizado e o ar quente; evaporação da água; e, separação do produto em pó (LABMAQ, 2003; LANNES; MEDEIROS, 2003; FELLOWS, 2006; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; ROSA; TSUKADA; FREITAS, 2010).

São necessárias temperaturas relativamente elevadas na atomização. As temperaturas de entrada e saída são aspectos importantes nesse tipo de processamento. A temperatura de entrada varia entre 121°C a 232°C. A atomização é acompanhada pelo aumento da pressão que vai de 500 a 600 Psi, seguida da evaporação instantânea da água pelo ar quente no interior da câmara de secagem. Geralmente opta-se pelo aquecimento indireto por prevenir a formação de odores indesejáveis, de óxido nítrico (FRONING, 2008) e levar a uma menor formação de

óxidos de colesterol (GUARDIOLA et al., 1995), os quais podem ser formados no aquecimento direto pelo uso de gás natural ou propano (FRONING, 2008).

A secagem se processa enquanto o ar quente e o produto, na forma de pequenas gotículas, percorrem a câmara de secagem até a separação do ar úmido e do produto seco. Em seguida, o ar úmido é retirado por exaustão (ciclones) e o produto seco na forma de pó é coletado, resfriado, peneirado e acondicionado (FRONING, 2008).

As condições normais de operação de atomização podem variar dependendo da aplicação e do sistema (direto ou indireto) de secagem utilizado. Estas condições devem ser ajustadas para produzir o teor de umidade desejado. O teor residual de umidade e tamanho da partícula podem ser controlados mudando as condições de funcionamento. O teor final de umidade é determinado pela umidade relativa do ar de saída e, se esse valor for demasiadamente elevado, as partículas de pó irão absorver, em vez de perder umidade. A temperatura de saída e umidade relativa do ar de saída também são importantes, mas só poderão ser controladas indiretamente por meio do ajuste das condições primárias. Dentre as condições primárias que podem ser controladas diretamente pelo operador, estão a temperatura de entrada, velocidade da bomba, a pressão da bomba e tamanho das partículas (ajuste do atomizador) (MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2012). Não há legislação brasileira específica que padronize os níveis de temperatura (mínimo ou máximo) e o tempo de desidratação do ovo. A Portaria n° 01 do MAPA (BRASIL, 1990), define “ovo desidratado” como o produto da desidratação do ovo em conformidade com o Art. 753 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 1952), estabelecendo que o mesmo deva satisfazer às seguintes condições:

1 - Não conter mais de 300.000 (trezentos mil) germes por grama, não conter germes patogênicos, leveduras ou outros que indiquem deterioração ou manipulação defeituosa;

2 - Não conter mais de 6% (seis por cento) de umidade;

3 - Revelar resíduo seco tendo aproximadamente a mesma composição que o deixado pelos ovos inteiros, ou pela clara ou pela gema;

4 - Não conter conservadores, exceção feita para sal (cloreto de sódio) ou açúcar na proporção máxima de 10% (dez por cento), isoladamente ou quando associados, calculados sobre resíduo seco;

5 - Satisfazer outras exigências deste Regulamento, na parte que lhes for aplicável.

O ovo atomizado é amplamente usado na preparação de alimentos por causa de sua segurança microbiológica e a redução do seu volume no que se refere ao produto em casca ou líquido (BERGQUIST, 1995), consequentemente, a atomização estende a sua vida de prateleira para 6 meses a 1 ano, não necessitando ser refrigerado (MEDINA, 2009). Entretanto, a segurança e a qualidade do ovo atomizado dependem da qualidade da matéria-prima, do processo de secagem e das condições de estocagem (GALOBART et al., 2002; CABONI et al., 2005).

2.4. EFEITO DA ATOMIZAÇÃO E DA ESTOCAGEM

O ovo por ser um alimento rico em colesterol e lipídios, torna-se susceptível à oxidação, principalmente quando submetido a processos que envolvem altas temperaturas, como é o caso da atomização. Assim há a aceleração das reações entre os lipídios e oxigênio molecular, resultando na formação de compostos indesejáveis. As condições de transporte e estocagem do ovo atomizado também contribuem para a degradação do colesterol e lipídios (MAZALLI; BRAGAGNOLO, 2007).

Durante o processamento do ovo atomizado podem ocorrer modificações químicas envolvendo a oxidação lipídica (ácidos graxos e colesterol) e o escurecimento não-enzimático, conhecido como a reação de Maillard, com formação de compostos indesejáveis (MISSLER; WASILCHUK; MERRIT, 1985; WAHLE; HOPPE; McINTOSH, 1993; BERGQUIST, 1995; GALOBART et al., 2001a; CABONI et al., 1997; 2005). Assim, dois tipos de reações químicas podem ocorrer durante a atomização: (I) degradação, desnaturação e inativação de compostos termolábeis ou

(II) formação de novos compostos que inicialmente não estavam presentes ou somente em níveis traço não transformados em produto (PELLEGRINO; RESMINI; LUF, 1995; CABONI et al., 2005).

A retirada da glicose (desugarização) do ovo antes da atomização o protege durante o aquecimento e estocagem em relação à formação de compostos da reação de Maillard. Esses compostos resultam da condensação dos grupos carbonila, do açúcar redutor, e amino, da proteína (ESKIN, 1990; FRIEDMAN, 1996; BELITZ, GROSCH, 1999; CABONI et al., 2005) e são responsáveis principalmente pelo sabor e cor indesejáveis observáveis em ovo em pó (BERGQUIST, 1995; CABONI et al., 2005). Dois métodos podem ser usados para a remoção da glicose do ovo líquido antes da atomização, por meio do controle da fermentação bacteriana usando culturas de *Saccharomyces cervisiae* e pelo uso do sistema oxidase-catalase (SEBRING, 1995). Favoravelmente, produtos da reação de Maillard possuem atividade antioxidante tornando o ovo atomizado mais estável durante a estocagem (SMITH; ALFAWAZ, 1995; ALAIZ; ZAMORA; HIDALGO, 1996; SHIZUCHI; HAYASE, 2003).

A auto-oxidação lipídica do ovo é influenciada pelas altas temperaturas durante a atomização, elevada área superficial do ovo e a presença de oxigênio, assim como condições inadequadas de transporte e estocagem (MAERKER, 1987; GUARDIOLA et al., 1995; CABONI et al., 2005; HUR; PARK; JOO, 2007). Com isso, a proteção conferida pelas proteínas (fosvitina da gema e conalbumina da clara) (FLOROU-PANERI et al., 2006), carotenóides (especialmente luteína e zeaxantina), lipoproteínas, tocoferóis, fosfolípides, como inibidores da oxidação, é significativamente reduzida (WAHLE; HOPPE; McINTOSH, 1993; GALOBART et al., 2001a; CABONI et al., 2005; WENZEL; SEUSS – BAUM; SCHLICH, 2010). Quanto menor a atividade de água e maior o tempo e a temperatura de estocagem, maior a oxidação do colesterol (HUBER; PIKE; HUBER, 1995; OBARA; OBIEDZINSKI; KOLCZAK, 2006; HUR; PARK; JOO, 2007). Quanto maior a quantidade de água do alimento maior a redução da concentração dos radicais livres, o que proporciona a recombinação de radicais livres com outras formas (não-radicais) de produtos que resultam na redução da oxidação (ANGELO, 1992).

Os óxidos de colesterol (OsC) estão entre os compostos formados durante o processamento e a estocagem do ovo (FINOCCHIARO; RICHARDSON, 1983; PIKE; PENG, 1985; MISSLER; WASILCHUK; MERRIT, 1985; TSAI; HUDSON, 1985; NOUROOZ-ZADEH; APPELQVIST, 1987; MORGAN; AMSTRONG, 1987, 1992; SANDER et al., 1989a, 1989b; ADDIS; PARK, 1992; BOSINGER; BRANDL, 1993; GUARDIOLA et al., 1994, 1995; LAI et al., 1995; CABONI et al., 2005; ESCARABAJAL; TENUTA-FILHO, 2005; MEDINA, 2009; ESCARABAJAL, 2011).

Nourooz-Zadeh e Appelqvist (1987) observaram que a estocagem sob refrigeração (4°C) preveniu a oxidação do colesterol na gema de ovo atomizada, por dois meses. Em outros estudos, verificou-se que as embalagens a vácuo e estocagem ao abrigo da luz preveniram a formação de óxidos de colesterol no ovo atomizado, estocado por dez meses (GUARDIOLA et al., 1994; ADDIS et al., 1996).

Kitahara (2004) pesquisou o efeito do processamento e da estocagem em relação à oxidação de ácidos graxos e colesterol. O ovo fresco foi estocado por 30 dias, e o pasteurizado por 7 dias, ambos a 8◦C, enquanto o liofilizado e o atomizado por 180 dias, ambos a 28◦C. Verificou que a liofilização e a atomização influenciaram na oxidação do colesterol (somatório de óxidos analisados: 25-hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol, 7α-hidroxicolesterol e 7β-hidroxicolesterol). As concentrações dos óxidos de colesterol observados em ovo líquido integral, atomizado e liofilizado foram de 22,80, 75,19 e 101,9, respectivamente. Entretanto o aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi mais efetivo na atomização (0,684 a 1,90 mg dialdeído malônico/ kg). Contudo, sem influenciar significativamente o perfil de ácidos graxos.

Caboni et al. (2005) avaliaram o efeito da atomização e estocagem (4°C e 20°C) na qualidade química do ovo integral. Observaram que a atomização industrial não afetou a composição dos tocoferóis (α-tocoferol e γ-tocoferol), mas provocou a reação de Maillard e aceleração da oxidação do colesterol, aumentando de 24 para 55µg a ocorrência de óxidos/g de lipídio. Não houve mudanças significativas nos compostos analisados (tocoferol, retinol, óxidos de colesterol e glicose) quando o ovo atomizado foi estocado a 4°C. Entretanto, durante a estocagem a 20°C, ocorreu aumento significativo de óxidos de colesterol, acima de 167µg/ g de lipídio, enquanto os tocoferóis e retinóis diminuíram.

Escarabajal e Tenuta-Filho (2005) avaliou a estabilidade do colesterol em ovo integral atomizado comercial, através da ocorrência do 7-cetocolesterol livre. Observou que o 7-cetocolesterol livre ocorreu em todas as cinco marcas analisadas de ovo integral atomizado, em teor médio de 84,01±5,34µg/g de lipídio. Não foi possível indicar claramente a evolução da oxidação do colesterol durante a estocagem do produto por até 224 dias, à temperatura ambiente (12 a 29°C). No entanto, foi constatada, uma correlação significativa entre o 7- cetocolesterol livre e as TBARS.

Medina (2009) observou que o ovo líquido integral pasteurizado e ovo integral atomizado industrializados, após a atomização houve redução de fenólicos totais (60%), carotenóides totais (25%) e ácidos graxos livres (73,5%). Contudo as concentrações das TBARS aumentaram (9,76%) com a atomização. Lai et al., (1996) constataram em ovo integral atomizado uma perda significativa de carotenóides, com perda adicional de 22 a 33% pela estocagem de até 4 meses. A redução observada dos fenólicos totais pode estar associada à sua volatilização e/ou oxidação com a atomização (TOMPKI; PERKINS, 2000).

Wenzel, Seuss-Baum e Schlich (2010) verificaram que a pasteurização da gema de ovo em escala laboratorial, não levou a mudanças críticas no conteúdo de carotenóides (xantofilas), ao contrário da atomização e liofilização que promoveram perdas respectivamente de 5,53% e 18,57%, segundos os autores induzidas por uma desnaturação de proteínas e desestabilização da matriz celular.

Escarabajal (2011) avaliou três marcas de ovos comerciais, não observando diferença entre elas, mesmo após o processamento (pasteurização e atomização), em relação à umidade, TBARS, lipídios totais, fenólicos totais, capacidade antioxidante (medida pelo radical DPPH*) e oxidação de colesterol. Além disso, foi verificado o efeito da atomização e da estocagem por 90 dias, na ausência de luz, a 25°C. Ao longo da estocagem, houve redução dos fenólicos totais e da capacidade antioxidante (DPPH), e aumento da umidade, dos óxidos de colesterol livres (25-hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol, 7α-hidroxicolesterol e 7β-hidroxicolesterol) e TBARS. Foi considerado que as respostas obtidas poderiam estar associadas ao uso de embalagem e condições de estocagem não ideais.

2.5. ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são definidos pela legislação brasileira como substâncias que retardam alterações oxidativas em alimentos (BRASIL, 2005). Para que sejam efetivos, tais compostos devem ser adicionados aos alimentos tão cedo quanto possível, seja no processo de fabricação ou no produto acabado, já que não reverte a oxidação de produtos já rancificados (CAMPOS; TOLEDO, 2000).

Os ácidos graxos presentes no ovo fresco não são facilmente oxidados (PIKE; PENG, 1985), permanecendo inalterados durante a estocagem (MARSHALL; SAMS; VAN ELSWYK, 1994; CHERIAN; WOLFE; SIM, 1996). Esta estabilidade pode ser atribuída aos antioxidantes naturais presentes, como os tocoferóis e carotenóides, e à estrutura das lipoproteínas de baixa densidade da gema (PIKE; PENG, 1985; BURLEY; VADEHRA, 1989; TERNES; LEITSCH, 1997; WENZEL; SEUSS–BAUM; SCHLICH, 2010). Fosfolípides e proteínas entrelaçadas na estrutura externa da gema de ovo, previnem a interação do oxigênio com núcleo da partícula de lipídio (PIKE; PENG, 1985; BURLEY; VADEHRA, 1989; CABONI et al., 2005). Entretanto, a oxidação é facilitada durante o processamento do ovo, especialmente quando envolve tratamento em altas temperaturas, como na atomização (MAZALLI; BRAGAGNOLO, 2007). O controle da estabilidade oxidativa é necessário para prevenir a perda nutricional, o comprometimento organoléptico e a produção de compostos tóxicos (KUBOW, 1990; CHOW, 1992; CAMPOS; TOLEDO, 2000).

A prevenção da oxidação de ácidos graxos e colesterol pelo uso de antioxidantes é frequentemente utilizada na indústria de alimentos (ALLEN; HAMILTON, 1983; NAMIKI, 1990; SIMIC; JAVANOVIC, 1994; GALOBART et al., 2001a, 2001b; LAROSA, 2011; BERTOLIN et al., 2010, 2011).

Os antioxidantes sequestram ou impedem a formação de radicais, ou seja, são doadores de prótons, e, algumas vezes, como quelantes de metais, evitando assim a reação em cadeia (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; FENNEMA, 2007; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008). Os produtos intermediários formados pela ação dos antioxidantes são relativamente estáveis (NAWAR, 1985; RAMALHO; JORGE, 2006). Assim, retardam ou impedem a deterioração dos alimentos, notadamente em

óleos e gorduras, evitando a formação de “ranço” pelo processo de oxidação (BERTOLIN et al., 2011). Existem dois tipos principais de ranço: o hidrolítico e o oxidativo. No ranço hidrolítico, ocasionado por lipases, ocorre à liberação de ácidos graxos responsáveis pelo odor desagradável. No ranço oxidativo, as cadeias dos ácidos graxos insaturados poderão, com o oxigênio, formar peróxidos que, posteriormente, poderão romper-se originando diversos compostos carbonilados (aldeídos, cetonas, alcoóis, ácidos, etc) de peso molecular mais baixo e responsável pelo odor desagradável dos compostos rançosos (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

Os antioxidantes não podem melhorar a qualidade perdida pela oxidação já existente no produto, mas sim diminuir a concentração de oxigênio, interceptar o oxigênio singlete, decompor os produtos primários da oxidação em espécies não radicais e quebrar cadeias para prevenir a propagação da reação de captura do hidrogênio (MELO; GUERRA, 2002; BERTOLIN et al., 2011).

São desejáveis as seguintes características para a seleção de antioxidantes: eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%); ausência de efeitos indesejáveis comprometendo a cor, o odor, o sabor e outras características do alimento; fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e estocagem; e, o composto e seus produtos da oxidação não podem ser tóxicos, mesmo em doses muito maiores das que normalmente seriam ingeridas no alimento. Além desses fatores, outros devem ser considerados, incluindo o atendimento da legislação vigente, custo e a preferência do consumidor por produtos naturais (BAILEY, 1996; RAMALHO; JORGE, 2006; TRINDADE, 2007; LAROSA, 2011). Em geral, existem duas categorias básicas de antioxidantes: os naturais e os sintéticos (FENNEMA, 1993; ZHENG; WANG, 2001; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Estudos indicam que há maior interesse da indústria de alimentos pelos antioxidantes naturais, devido à tendência dos consumidores em rejeitar os antioxidantes sintéticos em alimentos e à comprovação dos efeitos colaterais (alergia e doenças degenerativas) (BERTOLIN et al., 2010) ao organismo dos quando em doses elevadas (ZHENG; WANG, 2001; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004; RAMALHO; JORGE, 2006; FACCO; LAGE; GODOY, 2009; BERTOLIN et al., 2011).

Diversas pesquisas têm sido realizadas no intuito de serem encontrados produtos naturais com atividade antioxidante, para substituir os antioxidantes sintéticos ou fazer associação entre eles, diminuindo a quantidade desses últimos nos alimentos. Além da inibição da oxidação lipídica do alimento e aumento da sua estabilidade durante a estocagem, prolongando a vida de prateleira do produto, os estudos visam também combater microrganismos patogênicos (KULISIC et al., 2004; AI-LI; CHANG-HAI, 2006; RAMALHO; JORGE, 2006; ESTEVEZ et al., 2007; FASSEAS et al., 2007; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007; TRINDADE, 2007; BOZIN et al, 2008; TRINDADE; MANCINI-FILHO; VILLAVICENCIO, 2010; PERUMALLA; NAVAM, 2011).

2.5.1. Antioxidantes sintéticos

Antioxidantes sintéticos são usados como aditivos alimentares. São substâncias que tiveram o uso aprovado em alimentos, após investigações que comprovaram sua segurança dentro de um limite de ingestão diária; sendo assim, estão sujeitas a legislações específicas de cada país ou por normas internacionais. Entre os antioxidantes sintéticos aprovados, apenas quatro compostos apresentam ampla utilização na indústria de alimentos: butilato de hidroxianisol (BHA), butilato de hidroxitolueno (BHT), *terc*-butil hidroquinona (TBHQ) e, com menor frequência, galato de propila (PG) (BUCK, 1981; CAMPOS; TOLEDO, 2000; RAMALHO; JORGE, 2006; SOUSA et al., 2007; TAKEMOTO; TEXEIRA FILHO; GODOY, 2009; LAROSA, 2011).

A presença da estrutura fenólica nos antioxidantes sintéticos permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres (RAMALHO; JORGE, 2006; TIVERON, 2010).

O BHA é um dos mais eficazes e estáveis em alimentos, sendo bastante utilizado devido a sua solubilidade e resistência a altas temperaturas durante o processamento (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008). O TBHQ mostra-se mais eficiente em óleos vegetais, é mais estável que o BHA e BHT em temperaturas elevadas, sendo

considerado melhor antioxidante para óleos de fritura e produtos fritos. O PG perde sua eficiência em temperaturas elevadas (ARAÚJO, 2004).

O uso de antioxidantes no Brasil é controlado pelo Ministério da Saúde (BRASIL 1988; 2005). As concentrações máximas permitidas estão limitadas em 0,02 g/100 g, para o BHA, TBHQ, BHT e Galato de Propila, relativas à fração lipídica do alimento (BRASIL, 2005).

2.5.2. Antioxidantes naturais

Antioxidantes sintéticos como o BHA e BHT estão sendo tentativamente substituídos por antioxidantes naturais (QUI; SIM, 1998). No entanto, esta substituição depende do tipo, da concentração ideal (DEANS; RITCHIE, 1987), das características do alimento e do processamento, principalmente. Os tocoferóis (AJUYAH; HARDIN; SIM, 1993; WAHLE; HOPPE; MCINTOSH, 1993; CHERIAN; WOLFE; SIM, 1996), ácidos fenólicos (MATTHÄUS, 2002; BHALE et al., 2007) e carotenóides (BURTON, 1989; JORGENSEN; SKIBSTED, 1993), estão entre os antioxidantes naturais mais utilizados em alimentos (GALOBART et al., 2001a; 2001b; RAMALHO; JORGE, 2006)

Extratos obtidos de fontes naturais, como o alecrim (CORONADO et al., 2002; GEORGANTELIS et al., 2007; AFONSO; SANTANA; MANCINI-FILHO, 2010) e o chá verde (SCHMITZ et al., 2005; MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006; PERUMALLA; NAVAM, 2011) provaram possuir forte atividade antioxidante, devido ao elevado teor de compostos fenólicos. Esses extratos são de uso permitido em alimentos e substitutos potenciais de antioxidantes sintéticos (AHN; GRU; MUSTAPHA, 2007), devido à semelhante de sua atividade antioxidante (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; ANGELO; JORGE, 2007; TRINDADE, 2007; TRINDADE; MANCINI-FILHO; VILLAVICENCIO, 2010).

Os compostos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, que conferem propriedades antioxidantes (FERGUSON;

HARRIS, 1999; RAMALHO; JORGE, 2006). Os flavonóides e os ácidos fenólicos são os componentes que mais se destacam e são considerados os antioxidantes fenólicos mais comuns de fontes naturais (HERMANN, 1989; WARTHA et al., 2006).

2.5.2.1. Alecrim

O alecrim é uma especiaria obtida pela secagem das folhas da planta *Rosmarinus officinalis L*., contém uma vasta gama de diferentes compostos fenólicos com diversas atividades biológicas (BOTSOGLOU et al., 2005; FLOROU-PANERI et al., 2006). O alecrim pertence à família *Labiatae* e tem sido utilizado por suas propriedades medicinais, desde a antiguidade (ANGIONI et al., 2004). Em sistemas lipídicos, é reconhecido como o agente de maior potencial antioxidante (PEARSON et al., 1997; SANCHEZ-ESCALANTE et al., 2001; CORONADO et al., 2002). Além disso, seus maiores componentes bioativos têm mostrado possuir atividades antimicrobianas (PRASAD; SEENAYYA, 2000), anti-inflamatórias (DEL BANO et al., 2003; KUHLMANN; ROHL, 2006; LEE et al., 2008; MINICH et al., 2007; SILVA; 2008), antitumorais e quimiopreventivas (PÉREZ-FONS et al., 2006).

As propriedades antioxidantes do alecrim são atribuídas principalmente aos compostos fenólicos (GEORGANTELIS et al., 2007; AFONSO; SANTANA; MANCINI-FILHO, 2010), como os ácidos rosmarínico e caféico (MIURA; KIKUZAKI; NAKATANI, 2002; CHEN; SHI; HO, 1992; CUVELIER; BERSET; RICHARD, 1994; EXARCHOU et al., 2002; PIZZALE et al., 2002; PUKALSKAS; BEEK; WAARD, 2005; SHAN et al., 2005), carnosol, rosmanol, ácido carnósico, ácido 12-metilcarnósico, metilcarnosol, metilcarnosato, epirorosmanol, rosmadial, catequina (CHEN; SHI; HO, 1992; CUVELIER; BERSET; RICHARD, 1994; EXARCHOU et al., 2002; MIURA; KIKUZAKI; NAKATANI, 2002; PIZZALE et al., 2002; DORMAN et al, 2003; IBANEZ et al, 2003; PUKALSKAS; BEEK; WAARD, 2005; SHAN et al., 2005), carnosaldeído, epiisorosmanol, rosmariquinona e ácido ursólico (HOULIHAN; HO; CHANG, 1985; PUKALSKAS; BEEK; WAARD, 2005; SHAN et al., 2005). O ácido carnósico é o principal constituinte fenólico presente nas folhas de alecrim, com uma atividade

antioxidante cerca de três vezes maior do que carnosol e sete vezes maior que o BHA e BHT (BOTSOGLOU et al., 2005; FLOROU-PANERI et al., 2006).

Estudos mostram que o extrato de alecrim tem elevado potencial antioxidante em diversos produtos (LEE, 2005; SILVA, 2008; AFONSO; SANTANA; MANCINI-FILHO, 2010), incluindo presunto de peru (BARBUT; JOSEPHSON; MAURER, 1985), filé de pacu (SANTANA; MANCINI-FILHO, 2000), carne de caprino (NASSU et al., 2003), almôndega de carne de frango (RACANICCI et al., 2004), filé defumado de tilápia (SANTOS et al., 2007), filés de sardinha (PIEDADE, 2007) e hambúrguer bovino irradiado (TRINDADE; MANCINI-FILHO; VILLAVICENCIO, 2010), com consequente aumento da vida útil desses produtos. Além disso, o extrato de alecrim demonstrou ser mais efetivo contra a oxidação do que o BHA e BHT em óleo de soja e óleo de canola (RAMALHO; JORGE, 2006).

2.5.2.2. Chá verde

O chá verde *(Camellia sinensis L)* é uma planta da família *Theaceae*, também conhecido popularmente por chá da índia ou “green tea” (CAI et al., 2002; HIGDON, FREI, 2003; SIMÕES et al, 2004; MENDEL; YOUDIM, 2004; BUNKOVA; MAROVA; NEMEC, 2005; PRADO et al., 2005; MORAIS et al, 2009). Esta espécie é uma árvore muito ramosa, originária da Ásia Continental e da Indonésia e é cultivada em mais de 30 países, entre eles Índia, Sri Lanka, nos países da antiga União Soviética, Japão e Indonésia (SIMÕES et al, 2004; CAVALCANTE et al., 2007; LAMARÃO; FIALHO, 2009).

O chá verde é a bebida não alcoólica mais consumida no mundo depois da água (OWUOR et al., 2006; RUAN et al., 2007; LIMA; MAZZAFERA, 2009; OLIVEIRA, 2009; SENGER; SCHWANKE; GOTTLEB, 2010). Seus compostos bioativos, como os flavanóis, flavandióis, flavonóides, ácidos fenólicos, alcalóides, vitaminas e sais minerais (SCHMITZ et al., 2005) contribuem para a prevenção e o tratamento de várias doenças (YANG, WANG, 1993; TREVISANATO; KIM, 2000; HIGDON; FREI, 2003), com ações anti-inflamatória (HONG et al., 2001; ADCOCKS;

COLLIN; BUTLLE, 2002), antineoplásias malignas (YANG; WANG, 1993; HIGDON; FREI, 2003), antialérgica (SHIOKAZI et al., 1997), antiesclerótica (MIURA et al., 1994) e antibacteriana (HAMILTON-MILLER, 1995).

Suas folhas contêm componentes polifenólicos que totalizam cerca de 30% do peso seco das folhas. A maioria dos polifenóis do chá verde se apresentam como flavanóis, e dentre estes, predominam as catequinas. As quatro principais catequinas do chá verde são (-)-epicatequina (EC), (-)-epicatequina galato (ECG), (-)-epigalocatequina (EGC), (-)-epigalocatequina galato (EGCG) , sendo a EGCG a mais abundante (40-60%) entre todos os componentes fenólicos existentes na planta (KAJIYA et al., 2004; CAVALCANTE et al., 2007; LAMARÃO; FIALHO, 2009; SERON; FURLAN, 2010; SENGER; SCHWANKE; GOTTLEB, 2010). A principal propriedade terapêutica é a de antioxidante (CAI et al., 2002; HIGDON; FREI, 2003; SIMÕES et al., 2004; MENDEL; YOUDIM, 2004; BUNKOVA; MAROVA; NEMEC, 2005; PRADO et al., 2005; MORAIS et al, 2009) e inibidora do processo carcinogênico (RICE-EVANS et al., 1995; MUKHERJEE; SARKAR; SHARMA, 1997).

Extratos de chá verde tem sido aplicados em vários alimentos como pães (WANG; ZHOU, 2004), azeite de oliva extra virgem (ROSENBLAT et al., 2008), carne bovina, carne de ave, lingüiça, peixe (BOZKURT, 2006; MARTINEZ; CILLA; BELTRÁN, 2006; ALGHAZEER; SAEED; HOWELL, 2008; PERUMALLA; HETTIARACHCHY, 2011) e biscoitos (MILDNER-SZKUDLARZ et al., 2009).

Dai, Chen e Zhou (2008) verificaram que a mistura dos polifenóis do chá verde, α-tocoferol e vitamina C, poderiam atuar sinergisticamente para inibir a peroxidação do ácido linoléico. A adição de 1 ou 2% de chá verde ao ovo resultou na deformação da albumina, devido a agregação dos polifenóis com a albumina (WU; CLIFFORD; HOWELL, 2007). As epigalocatequina galato (EGCG) são 20 e 4 vezes mais efetivas, respectivamente, na prevenção da oxidação lipídica do que o α-tocoferol e o BHA (VUONG et al., 2011).

Bozkurt (2006) verificou que o extrato de chá verde (300ppm) foi mais eficaz do que o BHT (300ppm) na estabilidade oxidativa de ácidos graxos, em linguiças. O extrato de chá verde apresentou, *in vitro,* o maior conteúdo de fenólicos totais e maior capacidade antioxidante em relação aos extratos de erva mate, marcela e

própolis. No entanto, o extrato de marcela teve o melhor efeito na inibição da oxidação lipídica em carne mecanicamente separada de ave (PEREIRA, 2009).

A adição de 200-400ppm de chá verde em carnes bovina ou de ave demonstrou efeito inibitório significativo na oxidação lipídica, sem afetar os atributos sensoriais (PERUMALLA; NAVAW, 2011). As catequinas do chá verde demonstraram ação sinergística positiva na redução da oxidação lipídica em hambúrguer de carne de porco em combinação com extratos de alecrim ou de sálvia em níveis inferiores a 500ppm (MCCARTHY et al., 2001a, b).

Martinez, Cilla e Beltrán (2006) ao adicionarem chá verde (5ppm) e a mistura do extrato de alecrim (100ppm) e ácido ascórbico (50ppm) em linguiça suína, observaram uma forte inibição da oxidação lipídica. Enquanto, Alghazeer, Saeed e Howell (2008) verificaram que a adição de 250ppm de chá verde foi mais eficiente do que 500ppm na inibição da oxidação lipídica em cavala atlantica (*Scomber scombrus*).

Mildner-szkudlarz et al. (2009) adicionaram extrato de chá verde (20/100/1000ppm) e BHA (20ppm) em biscoitos, constatando que ambos os antioxidantes reduziram claramente a oxidação dos ácidos graxos, inibindo a decomposição dos ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados. A concentração de 1000ppm de chá verde resultou na inibição da formação de hidroperóxidos (47% a 73%) comparado ao BHA.

2.5.3. USO DE ANTIOXIDANTES

2.5.3.1. Suplementação em dietas de aves

A suplementação de dietas de galinhas com óleo de linhaça ou óleo de girassol afetou a composição dos ácidos graxos dos ovos, devido ao aumento de ácidos graxos poli-insaturados. Com a adição de α-tocoferol houve aumento da estabilidade lipídica dos ovos e esse efeito foi observado durante a estocagem do

produto atomizado, o que não foi observado com a adição das cantaxantinas (GALOBART et al., 2001a).

Gómez et al. (2002), avaliaram a qualidade sensorial de ovos de galinhas, alimentadas com antioxidantes naturais (alecrim e orégano), misturas de antioxidantes sintéticos (BHA e BHT) e óleo de linhaça. Constataram que os antioxidantes naturais e sintéticos usados isoladamente alteraram significativamente a aparência (cor amarela da gema mais clara), mas não o odor e o sabor, e o uso da linhaça reduziu a cor. Em estudo posterior, Gómez, Mendonça-Junior, Mancini-Filho (2003), verificaram que a adição de antioxidantes naturais (orégano e alecrim) na alimentação de galinhas conferiu melhor estabilidade oxidativa aos ovos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3.

Pita et al. (2004) verificaram o efeito da adição de óleo de linhaça, óleo de canola e vitamina E, à dieta de galinhas e o possível reflexo na composição lipídica e incorporação de α-tocoferol na gema do ovo. Observaram que a inclusão do óleo de linhaça na dieta aumentou a incorporação de ácidos graxos poli-insaturados e diminuiu a de monoinsaturados. A incorporação de antioxidantes teria dupla finalidade, a de proteger os ácidos graxos da gema contra a oxidação e o enriquecimento do alimento com vitamina E.

Galinhas alimentadas com dietas suplementadas com extrato de orégano (5000ppm) produziram ovos com menor oxidação lipídica do que quando suplementadas com alecrim (5000ppm). A oxidação lipídica do ovo foi maior quando a ração continha açafrão (20ppm) (BOTSOGLOU et al., 2005).

Florou-Paneri et al., (2006), observaram que as galinhas alimentadas com 5g de alecrim/kg ração apresentaram ovos com menor taxa de oxidação, comparado com a ração que continha 10g de alecrim/kg ração. Quando as aves foram alimentadas com vitamina E (0,2g/kg ração) os ovos obtidos mostraram menor taxa de oxidação em relação aos resultados verificados com o alecrim.

2.5.3.2. Ovo e produtos derivados

Morgan e Armstrongan (1987) adicionaram antioxidantes (BHA, BHT e galato de propila) à gema líquida, submetida à oxidação induzida pelo peróxido de hidrogênio. Verificaram que nas concentrações usadas (67ppm e 200ppm) os antioxidantes testados não foram eficientes na inibição da oxidação do colesterol durante a estocagem (durante 7 meses, em frascos de vidro, em temperatura ambiente e no escuro) do produto atomizado.

A eficiência antioxidante do alecrim (na forma de oleoresina), miricetina, quercitina, isômeros de tocoferol (α, β e γ) isolados e em associação com BHA foi avaliado por Rankin e Pike (1993), em relação à oxidação do colesterol medida pelo 7-cetocolesterol. O resultado observado foi que somente os isômeros de tocoferol (isoladamente) promoveram a inibição efetiva da autoxidação do colesterol e da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados.

A incorporação de várias concentrações de α-tocoferol em dietas de galinha, feita por Wahle, Hoppe e Mcintosh (1993), promoveu a obtenção de ovos com diferentes níveis de antioxidante. Após a atomização dos ovos e estocagem (18 meses) do produto à temperatura ambiente (25°C), com exposição ao ar e à luz, foi observada uma relação inversa entre a formação de óxidos de colesterol (7-cetocolesterol, 7α-hidroxicolesterol, 7β-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, 5,6-epoxicolesterol e colestanotriol) e o conteúdo de α-tocoferol.

Huber, Pike e Huber (1995) verificaram que, após a oxidação induzida com sulfato de cobre e estocagem acelerada (60ºC/28 dias) da gema de ovo atomizado, a adição de antioxidantes (BHA, palmitato de ascorbila e mistura de tocoferóis) não foi suficiente para impedir completamente a oxidação do colesterol, no entanto, a presença de antioxidantes reduziu os níveis de 7-cetocolesterol, 7α-hidroxicolesterol e 7β-hidroxicolesterol, enquanto os níveis de triol e epóxidos não foram afetados. Todos os antioxidantes usados demonstraram significativo efeito inibidor da oxidação com relação ao controle, mas os tocoferóis foram mais efetivos do que o palmitato de ascorbila. Entretanto, Brinkerhoff et al. (2002) em estudo posterior, analisaram a oxidação do colesterol em gema atomizada, estocada sob temperatura

ambiente, por 36 meses, na presença dos mesmos antioxidantes usados por Huber, Pike e Huber (1995), e verificaram a inibição da formação de 7-cetocolesterol e uma maior formação de 7α-hidroxicolesterol e 7β-hidroxicolesterol.

O TBHQ (200ppm) e óleoresina de alecrim (500 e 1000ppm) quando adicionados ao ovo integral atomizado não conseguiram impedir a oxidação do colesterol, segundo Lai et al. (1995). Estes autores atribuíram a ineficiência observada dos antioxidantes à uma provável volatilização e subsequente perda durante a atomização.

Guardiola et al. (1997) adicionaram ao ovo líquido integral uma mistura de palmitato de ascorbila com α-tocoferol e galato de propila (isoladamente), antes da atomização, com estocagem posterior por até 10 meses (embalagem à vácuo e ao abrigo da luz). A associação do palmitato de ascorbila com o α-tocoferol (100ppm e 200ppm) resultou num ligeiro efeito pró-oxidante. Enquanto, o galato de propila na concentração de 100ppm preveniu a perda de ácidos graxos poli-insaturados e a formação de óxidos de colesterol, e em 200ppm preveniu a perda da cor (associada à oxidação de carotenóides).

Em estudo feito por Medina (2009), sobre a estabilidade de ovo pasteurizado atomizado industrialmente, foi verificado que a adição de extrato comercial de tocoferóis (Guardian™ Toco 70) não evitou o aumento das TBARS e dos ácidos graxos livres, ou a redução dos carotenóides totais, ao longo de 90 dias (temperatura ambiente, bolsas herméticas de polietileno de baixa densidade - ZipLoc). Mas reduziu a formação de óxidos de colesterol (7-cetocolesterol, 7α-hidroxicolesterol, 7β-hidroxicolesterol e 25-hidroxicolesterol) em relação ao controle, demonstrando melhoria significativa no produto final.

Escarabajal (2011) avaliou a estabilidade do colesterol do ovo integral pasteurizado atomizado em laboratório, adicionado de extratos comerciais de alecrim (1500ppm) e de tocoferóis (300ppm), observando que ambos não foram efetivos na prevenção da oxidação induzida por sulfato de cobre.

2.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Existe uma grande variedade de testes para verificar a atividade antioxidante (SCHWARZ et aL., 2001; KUSKOSKI et al., 2005; LONGHI, 2007). Os métodos podem ser classificados em dois grupos: métodos que avaliam a habilidade de sequestrar radicais livres e métodos que testam a habilidade de inibir a oxidação lipídica (SCHWARZ ET AL., 2001; ARUOMA, 2003).

A atividade antioxidante *in vitro* é determinada por vários fatores, tais como sua atividade frente ao radical, número de radicais que consegue seqüestrar, a destruição do radical pelo antioxidante, a concentração e a mobilidade, a interação com outros antioxidantes e o sítio de geração e reatividade do radical (NIKKI, 2002).

Não existe um método satisfatório que consiga avaliar a atividade antioxidante total de uma amostra, pois vários mecanismos antioxidantes podem ocorrer (OU et al., 2002).

Os métodos para avaliação da atividade antioxidante apresentam dificuldades a serem comparados devido à sua complexidade e diferentes princípios das reações. Alguns chegam a reproduzir resultados diferentes e até menos contraditório o que impossibilita esse tipo de comparação (ALONSO et al., 2002).

2.6.1. Ensaio de redução do complexo de fosfomolibdênio

O método do complexo fosfomolibdênio é frequentemente utilizado para avaliar a capacidade antioxidante total da fração lipofílica e hidrofílica. Baseia-se na redução do molibdênio IV a molibdênio V pela amostra analisada e subsequente formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio V em pH ácido, determinado espectrofotometricamente a 695 nm.

A solução teste inicial possui coloração amarelada, tornando-se verde à medida que a solução de fosfato de molibdênio se reduz. Para que seja atingido o máximo de formação do complexo de fosfomolibdênio, é necessário um período de 90 minutos (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999; MOHAMED; PINEDA; AGUILAR, 2007; LONGHI, 2007; SILVEIRA, 2010).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do processamento (pasteurização e atomização), da estocagem e da adição de antioxidantes, naturais e sintético, sobre a estabilidade oxidativa lipídica do ovo obtido em laboratório.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Padronizar o método do fosfomolibdênio para avaliação da capacidade antioxidante total da fração lipídica do ovo;
- ✓ Investigar o efeito da pasteurização e da atomização do ovo no que se refere à capacidade antioxidante e à estabilidade oxidativa da fração lipídica do ovo;
- ✓ Avaliar a estabilidade oxidativa de ácidos graxos e a capacidade antioxidante do ovo integral pasteurizado atomizado, estocado a 5ºC, por 90 dias;
- ✓ Verificar por meio de teste de concentração de antioxidantes, a estabilidade oxidativa lipídica do ovo integral pasteurizado atomizado adicionado da mistura de extrato de alecrim, extrato de chá verde e BHA;
- ✓ Otimizar a concentração da mistura de extrato de alecrim, extrato de chá verde e BHA a ser adicionada ao ovo líquido integral pasteurizado, posteriormente atomizado, pelo modelo matemático proposto pela metodologia de superfície de resposta;
- ✓ Investigar o efeito da mistura otimizada de extrato de alecrim, extrato de chá verde e BHA na estabilidade oxidativa lipídica do ovo integral pasteurizado atomizado, estocado sob as temperaturas de 5°C e 25ºC, por 90 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Reagentes

Foram utilizados, n-Hexano, grau UV/HPLC, VETEC, código 2012; iso-propanol, grau UV/HPLC, Sigma-Aldrich, código 67-63-0; 7-cetocolesterol (3β-hidroxicolest-5α-ene-7-one), Sigma-Aldrich, código C2394; 7α-cetocolesterol (colest-5-ene-3β-, 7α-diol), Steraloids, código C6420; 7β-cetocolesterol (colest-5-ene-3β-, 7β-diol), Steraloid, código C6430; Florisil (MgO:SiO2, 15:85), Merck, código 1.12518.0100; reativo de Folin Ciocalteu, Dinâmica, código 2336; α- tocoferol, Sigma-Aldrich, código T3251; acetona, VETEC, código 187; ácido clorídrico, Synth, código 30650; ácido tiobarbitúrico, Merck, código 1.08180.0025; ácido tricloroacético, VETEC, código 466; clorofórmio, VETEC, código 192; álcool metílico, VETEC, código 102; hexano PA, Synth, código H1007.01.BJ; n-heptano, Sigma-Aldrich, código 101129628; sulfato de sódio anidro, Synth, código S2032. 01. AG; cloreto de sódio, Synth, código 36300; ácido sulfúrico, Synth, código 31190; molibdato de amônia, VETEC, código 122; fosfato de sódio monobásico, Grupo química, código 0752; etanol, Grupo química, código 01004; ácido gálico, Sigma-Aldrich, código G7384; fenolftaleína, Synth, código F1005. 01. AE; hidróxido de sódio, Synth, código H2000. 01. AG; antioxidantes naturais da Danisco: Extrato de chá Verde - Guardian™ Green Tea Extract 20M e Extrato de alecrim - Guardian™ Rosemary Extract 08; e BHA (butilato de hidroxianisol) Synth, código B1028.02.AE. Todos com grau de pureza analítica.

4.1.2. Amostras

O ovo comercial, de uma única marca, selecionado para os experimentos, foi o do Grupo I – Branco tipo grande, comumente utilizado no preparo do produto atomizado. As amostras de ovo *in natura* (em casca) embaladas há no máximo 10 dias foram adquiridas em supermercados, na cidade de São Paulo-SP.

Foram ensaiadas para cada experimento, amostras em triplicata, cada qual representada por 12 a 20 ovos, isentos de casca, que ficaram estocadas na própria embalagem comercial, mantidas em temperatura ambiente (25±2°C) até o início dos experimentos (por até 2 dias). As unidades de ovos utilizadas em cada amostra dependiam da quantidade de amostra suficiente para realizar cada experimento. O prazo de armazenamento correspondeu ao indicado pelo fabricante de 30 dias de validade.

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção do ovo líquido integral

Ovos isentos das cascas foram manualmente homogeneizados em béquer (revestido com folha de alumínio), usando bastão de vidro, e peneirados em tela de náilon (1mm^2) visando reter a membrana da gema (chalaza). A amostra peneirada foi transferida para um processador de alimentos (WALITA RI7633), para a completa homogeneização entre a clara e a gema, sob vácuo, durante 1 minuto. A amostra homogeneizada foi transferida para um kitassato mantido sob banho de gelo e aplicado vácuo por meio de uma bomba de vácuo (QUIMIS Q355B), para que assim houvesse a eliminação de bolhas de ar formadas na operação anterior (ESCARABAJAL, 2011).

4.2.2. Pasteurização do ovo líquido integral

O ovo líquido integral obtido, conforme descrito anteriormente, foi pasteurizado em banho-maria (FISATON 550) a 65ºC, por 3 minutos efetivos, seguido da redução imediata da temperatura, por imersão em banho-de-gelo até à temperatura próxima de 0°C (ESCARABAJAL, 2011).

4.2.3. Atomização do ovo líquido integral pasteurizado

O ovo líquido integral pasteurizado, obtido como indicado anteriormente, foi diluído com água destilada, na proporção 1:3 (v:v), para então ser submetido à desidratação, usando o atomizador do tipo *Mini Spray Dryer* BUCHI B-290 (BUCHI, 2009). A Figura 10 mostra o desenho esquemático do processo de atomização do *Mini Spray Dryer* BUCHI B-290 e do fluxo do ar de secagem .

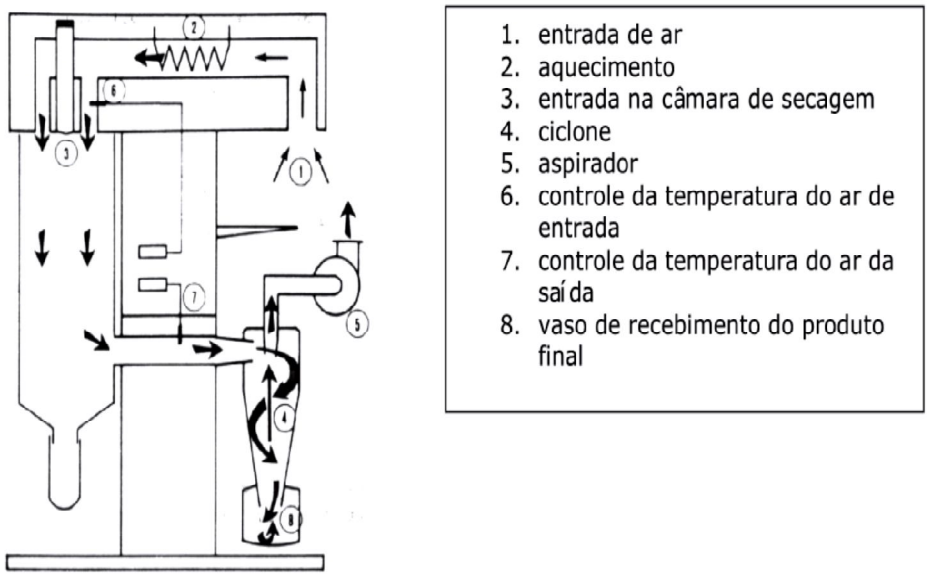


Figura 10. Esquema do *Mini Spray Dryer* BUCHI B-290 e do fluxo do ar de secagem (LANNES; MEDEIROS, 2003; BUCHI, 2009).

As características técnicas do atomizador corresponderam à: temperatura máxima de desidratação, 220°C; diâmetro do bico atomizador, 0,7mm; gás utilizado, nitrogênio; capacidade máxima de evaporação, 1L/h. O equipamento opera com bico atomizador com fluxo paralelo, possibilitando tanto ao produto a ser atomizado como ao ar de desidratação, fluírem na mesma direção. O gás nitrogênio (inerte) foi usado para prevenir a oxidação de ácidos graxos e do colesterol durante a atomização.

As temperaturas de entrada e de saída são fatores importantes na atomização, onde a última não pode ser controlada, devido a uma limitação do equipamento utilizado, por depender dos parâmetros escolhidos na operação (temperatura de entrada, ajuste do aspirador, desempenho da bomba de alimentação e do isolador térmico do cilindro) (BUCHI, 2009; LANNES, 2008; ESCARABAJAL, 2011).

As condições empregadas na atomização do ovo líquido integral pasteurizado foram: temperatura de entrada, 170°C; temperatura de saída, 55±7°C; vazão de alimentação, 15mL/min; fluxo do atomizador, 439L/h; tempo de operação 1h/L de ovo líquido; e concentração de sólidos, 0,07g/mL. Um tecido de algodão foi usado como isolante térmico do cilindro, com o objetivo de obter a temperatura de saída desejada (ESCARABAJAL, 2011).

4.2.4. Estudo da capacidade antioxidante e da estabilidade oxidativa lipídica do ovo líquido integral, do ovo líquido integral pasteurizado e do ovo integral pasteurizado atomizado obtido em laboratório

4.2.4.1. Efeito da pasteurização e atomização sobre o ovo líquido integral

O ovo líquido integral (controle), ovo líquido integral pasteurizado e o ovo integral pasteurizado atomizado foram avaliados quanto ao efeito dos processamentos correspondentes sobre a capacidade antioxidante e a estabilidade oxidativa lipídica dessas matrizes. As amostras foram analisadas imediatamente após o processamento, em relação aos lipídios totais (LP), a capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), as substâncias reativas ao ácido

tiobarbitúrico (TBARS) e aos óxidos de colesterol livres 7α-hidroxicolesterol (7α-OH), 7β-hidroxicolesterol (7β-OH) e 7-cetocolesterol (7-CETO).

4.2.4.2. Efeito da estocagem sobre o ovo integral pasteurizado atomizado

Foi avaliado o efeito da estocagem sobre a capacidade antioxidante total da fração lipídica e a estabilidade oxidativa lipídica do ovo integral pasteurizado atomizado, estocado em frasco de polietileno de alta densidade, ao abrigo da luz, sob atmosfera de nitrogênio, durante 1, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias, a 5±2ºC. As amostras foram analisadas a partir de 1 dia após o processamento, em relação à umidade, a capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

4.2.4.3. Efeitos da adição e concentração da mistura de antioxidantes (extrato de alecrim, extrato de chá verde e BHA) sobre a estabilidade oxidativa lipídica do ovo integral pasteurizado atomizado

Por meio de teste de concentração de antioxidantes, usando a metodologia de superfície de resposta (RSM), foram adicionados antioxidantes (Extrato de alecrim - Guardian™ Rosemary Extract 08; Extrato de Chá Verde - Guardian™ Green Tea Extract 20M e BHA) em diferentes concentrações ao ovo líquido integral pasteurizado, antes da atomização. Adotou-se um delineamento experimental completo do tipo 2^3, com 2 replicatas no ponto central, totalizando 11 ensaios independentes (MONTGOMERY, 2000), como é mostrado na Tabela 3. Na Tabela 4 encontram-se os níveis das variáveis independentes testadas em misturas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 3. Delineamento experimental adotado

Ensaios	Alecrim	Chá verde	BHA
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11*	- AA	- AA	- AA

*Sem antioxidante

Tabela 4. Níveis das variáveis independentes a serem testadas

Alecrim (ppm)			Chá verde (ppm)			BHA (ppm)		
-1	0	1	-1	0	1	-1	0	1
200	600	1000	100	300	500	100	150	200

Não foi encontrada legislação específica para adição de extratos de alecrim (Guardian™ Rosemary Extract 08) e chá verde (Guardian™ Green Tea Extract 20M) em alimentos. Portanto, as concentrações dos extratos de alecrim e chá verde encontram-se dentro dos limites recomendados pela DANISCO (2011), enquanto que a concentração do BHA está de acordo com a legislação brasileira (BRASIL,

2005). Nas tabelas 5 e 6 encontram-se o laudo técnico dos extratos de rosemary e chá verde, respectivamente.

Tabela 5. Laudo técnico do Guardian™ Rosemary Extract 08 – DANISCO

Composição	
Extrato de alecrim (INS392)	Mono e diglicerídeos de ácidos graxos (E471) Éster de ácido acético de mono e diglicerídeos (INS472a) Propileno glicol (E1520)
Especificações físico-químicas	
Forma a 25°C	Líquido
Cor	Marrom
Compostos fenólicos	Ácido carnósico 2.7 a 3.3% Diterpenos fenólicos 4 a 4.7%
Dosagem recomendada	0,2g a 1g/ Kg de óleo ou gordura

Tabela 6. Laudo técnico do Guardian™ Green Tea Extract 20M – DANISCO

Composição	
Extrato de chá verde	20% de catequinas e 80% de maltodextrina
Especificações físico-químicas	
Forma a 25°C	Pó
Cor	Pêssego claro
Dosagem recomendada	0,1g a 0,5g/ Kg de óleo ou gordura

Os antioxidantes (extrato de alecrim, extrato de chá verde e BHA) antes de serem adicionados ao ovo líquido integral pasteurizado foram solubilizados, respectivamente, em 10mL de etanol, água destilada e etanol, sob agitação magnética (1 a 2 minutos). Dessa forma, a concentração em ppm dos antioxidantes adicionados ao ovo líquido integral pasteurizado baseou-se na concentração de lipídios totais do ovo líquido integral. O produto atomizado obtido foi mantido a 5±2ºC por até dois dias, até à realização das análises. Os parâmetros analíticos adotados foram: lipídios totais, capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL),

substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), ácidos graxos livres (AGL), capacidade redutora pelo reativo de Folin-Ciocalteu (CR-F) e substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233).

4.2.4.4. Otimização das concentrações da mistura de antioxidantes (extrato de alecrim, extrato de chá verde e BHA) pelo modelo matemático proposto pela metodologia de superfície de resposta

A otimização da concentração da mistura de antioxidantes procedeu-se com o uso da função de desejabilidade, que seguiu a imposição computacional exaustiva nos pontos com respostas ótimas (DERRINGER; SUICH, 1980).

Novas amostras de ovo líquido integral pasteurizado foram preparadas e a elas adiciona a uma nova combinação de antioxidantes definida pelo programa estatístico (SAS, 1997) como ótima, em seguida foram atomizadas e submetidas aos mesmos protocolos experimentais para averiguar a adequabilidade dos modelos em seu poder preditivo e o valor previsto.

4.2.4.5. Efeitos da adição da mistura otimizada de antioxidantes (extrato de alecrim, extrato de chá verde e BHA) e das condições de estocagem sobre a estabilidade oxidativa lipídica do ovo integral pasteurizado atomizado

Uma vez conhecidas as concentrações ótimas dos antioxidantes, os mesmos foram adicionados ao ovo líquido integral pasteurizado antes da atomização. O produto atomizado foi estocado em frasco de polietileno de alta densidade, opaco, sob atmosfera de nitrogênio, a 5±2°C e 25±2ºC, e analisado após 1, 30, 60 e 90 dias. A atmosfera desejada (inerte) foi viabilizada pelo deslocamento do ar interno da embalagem, por jato de nitrogênio, com imediato rosqueamento da tampa do frasco. Os parâmetros analíticos adotados foram: umidade, capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias absorvidas a 233nm (AS-233) e óxidos de colesterol livres (7α-hidroxicolesterol (7α-OH), 7β-hidroxicolesterol (7β-OH) e 7-cetocolesterol (7-CETO)).

4.2.5. Quantificações analíticas

4.2.5.1. Umidade

Determinada após a secagem da amostra em estufa (FABBE PRIMAR 219) a 105°C, até peso constante em balança analítica (METTLER TOLEDO AG285) (AGÊNCIA NACIONAL DE VGILÂNCIA SANITÁRIA: Instituto Adolfo Lutz, 2005).

4.2.5.2. Lipídios totais

Feita por gravimetria em balança analítica (METTLER TOLEDO AG285), após a extração com clorofórmio/metanol (2:1, v/v), segundo o método de Folch, Lees e Stanley (1957), adaptado por Csallany et al (1989), com adição de NaCl 0,88%, no caso do ovo líquido, com posterior eliminação do solvente (32ºC, sob vácuo) em rotaevaporador (TECNAL TE210) e aquecimento em estufa (FABBE PRIMAR 219) a 105°C/40 minutos.

4.2.5.3. Quantificação dos óxidos de colesterol livres

Os óxidos de colesterol analisados foram o 7-cetocolesterol (7-CETO), 7α-hidroxicolesterol (7α-OH) e 7β-hidroxicolesterol (7β-OH), na forma livre. Para a quantificação desses óxidos, a extração lipídica seguiu o que foi indicado antes, clorofórmio e metanol, na proporção de 2:1 (v/v) (FOLCH; LEES; STANLEY, 1957). O extrato lipídico obtido (50-60 mg) foi solubilizado com n-heptano/isopropanol (98:2, v/v), adicionado em coluna de Florisil (500 mg) e eluído com acetona, sendo esta evaporada posteriormente, a 40ºC, sob vácuo (PENAZZI et al.,1995), em rotaevaporador (TECNAL TE210).

Para a detecção dos óxidos de colesterol livres, por CLAE o resíduo da evaporação anterior foi ressuspenso em 2 mL da fase móvel hexano/isopropanol, 93:7, v/v, filtrado em membrana durapore (Millex-Millipore), com 0,45 µm de diâmetro, e injetado (20 µL) pelo injetor automático (SIL-10AD$_{VP}$) em cromatógrafo HPLC (SHIMADZU LC-10ADVP). Foi usada coluna de sílica µ-Porasil, com poro de 10 µm de diâmetro, de 30 x 0,39 cm, marca Waters, em fase normal, e com fluxo com vazão de 1,0 mL/minuto. O monitoramento se deu a 206nm, para o 7α-OH e 7β-OH, e a 233nm, para o 7-CETO, utilizando detector de arranjo de fotodiodos (UV-VIS) SPD- M10AD$_{VP}$ (CSALLANY et al., 1989; KITAHARA, 2004; MEDINA, 2009; ESCARABAJAL, 2011).

A metodologia considerou argumentos contidos na literatura (CSALLANY et al., 1989) de que a quantificação dos óxidos de colesterol totais, por usar a saponificação, poderia levar à destruição de óxidos (7-cetocolesterol, principalmente) e/ou formação de outros. A metodologia utilizada foi padronizada anteriormente (KITAHARA, 2004; MORALES-AIZPURÚA; TENUTA-FILHO, 2005).

4.2.5.4. Quantificação das substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233)

As substâncias com absorções máximas a 233 nm (com é o caso do 7-cetocolesterol), ou parcial (não identificadas no presente trabalho) (CHEN, CHEN, 1994), foram quantificadas como AS-233 e expressas em equivalentes de 7-cetocolesterol. Como já apontado, o 7-cetocolesterol é considerado o óxido mais frequentemente encontrado como produto da oxidação do colesterol, sendo proposto que a sua ocorrência sirva para caracterizar tal evento.

Para a quantificação das substâncias absorvidas a 233 nm, a extração lipídica seguiu o que foi indicado antes, clorofórmio e metanol, na proporção de 2:1 (v/v) (FOLCH; LEES; STANLEY, 1957). O extrato lipídico obtido (50-60 mg) foi solubilizado com n-heptano/isopropanol (98:2, v/v), adicionado em coluna de Florisil (500 mg) e eluído com acetona, sendo esta evaporada posteriormente, a 40ºC, sob vácuo (PENAZZI et al.,1995), em rotaevaporador (TECNAL TE210).

Para a detecção e quantificação das AS-233, o resíduo da evaporação foi ressuspenso em 3 mL de hexano (grau HPLC), filtrado em membrana durapore (Millex-Millipore) com 0,45 µm de diâmetro e quantificadas por meio do espectrofotômetro de UV-Visível (SHIMADZU 1800) a 233 nm.

4.2.5.5. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O método empregado para quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi o de Vyncke (1970), que propõe a extração da amostra com ácido tricloroacético, seguido pela reação com o ácido tiobarbitúrico e leitura do complexo formado em espectrofotômetro VIS (TECNAL B572) a 535 nm. Este método baseia-se na reação de MDA (dialdeído malônico) com TBA (ácido tiobarbitúrico) para se obter um pigmento vermelho, o que resulta a partir da condensação de duas moléculas de TBA com uma molécula de MDA e a eliminação provável de duas moléculas de água. Os resultados foram expressos em mg dialdeído malônico/quilograma.

4.2.5.6. Ácidos graxos livres (AGL)

A metodologia para quantificação dos ácidos graxos livres contemplou a extração da fração lipídica com clorofórmio/metanol (2:1, v/v), por 10 minutos, em agitador magnético, e filtração em papel de filtro (contendo 10 g de sulfato de sódio anidro) para um balão de evaporação previamente tarado, conforme Folch; Lees; Stanley (1957), e adaptado por Csallany et al (1989) pela adição de NaCl 0,88% (para separação das fases hidrofílica e lipofílica), no caso do ovo líquido.

O solvente foi rotaevaporado (TECNAL TE210) a 32°C, sob vácuo e o resíduo submetido a um fluxo de nitrogênio, até peso constante. Foram adicionados 25 mL de álcool etílico (95%) previamente neutralizados como NaOH 0,1M, adicionadas 4 gotas de fenolftaleína e procedida a titulação com solução

padronizada de hidróxido de sódio 0,1M, até que o aparecimento de coloração rósea persistisse por 30 segundos. Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido oléico (AGÊNCIA NACIONAL DE VGILÂNCIA SANITÁRIA: Instituto Adolfo Lutz, 2005).

4.2.5.7. Capacidade redutora pelo reativo de Folin-Ciocalteau (CR-F) - Fenólicos totais

A extração dos fenólicos totais foi feita segundo Medina (2009) e a quantificação pelo método de Zhang et al. (2006). A 0,75g de ovo líquido ou em pó foram adicionados 20 mL da solução metanol: água (70:30, v/v, contendo 1% de HCl) e procedida a homogeneização, por 40 minutos, em agitador magnético (color SQUID - IKA).

O extrato foi centrifugado por 10 minutos, a 1000xg, e o sobrenadante filtrado em papel comum contendo sulfato de sódio anidro. A uma alíquota de 200 µL do extrato foi adicionado 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteau 1:10 (1 mL de Folin-Ciocalteau concentrado: 10 mL de água destilada) e, após 5 minutos, 800 µL de solução de carbonato de sódio (7,5%). A mistura foi homogeneizada, mantida no escuro e em repouso, por 2h, e a absorbância lida em espectrofotômetro VIS (TECNAL B572) a 750 nm. Os fenólicos totais foram expressos em mg de ácido gálico/100 mL do extrato.

4.2.5.8. Capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL)

Foi adotado o método do fosfomolibdênio, idealizado por Prieto, Pineda e Aguilar (1999) e ajustado por Mohamed, Pineda e Aguilar (2007) para determinar a capacidade antioxidante apresentada tanto por substâncias hidrossolúveis como lipossolúveis. O método em questão foi usado em outros alimentos como, sementes de milho, soja (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999), semente de mucuna (LONGHI, 2007), casca de laranja, gérmen de trigo, casca de banana, semente de girassol,

pele de tomate (MOHAMED; PINEDA; AGUILAR, 2007) e sabugo de milho (SILVEIRA, 2010), mas não em relação ao ovo ou produtos derivados, requerendo, portanto, a necessária adaptação e padronização.

O método do fosfomolibdênio baseia-se na redução do molibdênio VI [provido no reagente fosfomolibdato pelo $(NH4)_6Mo_70_{24}$] a molibdênio V, pela(s) substância(s) ativa(s), com formação de um produto de cor verde formado pelo complexo $Mo(V)+P0_4$, em pH ácido, com absorção máxima a 695 nm (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999; MOHAMED; PINEDA; AGUILAR, 2007).

4.2.5.8.1. Extração

Em tubo de centrífuga, com capacidade de 50 mL, foram adicionadas 5g de sulfato de sódio anidro e, em seguida, 1g de ovo líquido ou 1g de ovo atomizado, previamente homogeneizado (o sulfato foi omitido quando a amostra era o ovo atomizado). O sulfato e a amostra foram homogeneizados entre si, com bastão de vidro, adicionados de 10 mL de hexano e agitados, primeiramente em agitador de tubos (PHOENIX AT56), por 2 minutos, e depois em plataforma de agitação (HEIDOLPH UNIMAX 2010), velocidade 6, por uma hora. Os tubos foram mantidos em isopor com gelo e ao abrigo da luz, durante a extração. Completada a extração, os tubos foram centrifugados (SORVALL RC5C) a 9000xg/10 minutos, mantendo a temperatura entre 0ºC a 5ºC, o sobrenadante filtrado em papel, transferido para um balão volumétrico de 25mL e o volume final completado com hexano.

4.2.5.8.2. Preparo do reativo de fosfomolibdato

O reativo foi necessariamente preparado momentos antes do uso. Alíquotas de 8,6 mL das soluções de molibdato de amônio (4mM), fosfato de sódio monobásico (32mM) e ácido sulfúrico (0,6M), respectivamente, foram transferidas para um balão volumétrico e o volume completado para 25 mL, com de água destilada.

4.2.5.8.3. Procedimento

Alíquota de 0,5mL do extrato obtido anteriormente foi transferida para um tubo eppendorf, dotado de tampa rosqueável, e o solvente eliminado por evaporação, sob jato de gás nitrogênio. O resíduo foi ressuspendido em 0,2mL de etanol, adicionado de 1mL do reativo fosfomolibdato, homogeneizado em agitador de tubos, aquecido em banho-maria (FISATON 550) a 95°C, por 90 minutos, resfriado em banho de gelo, por 5 minutos, e em seguida submetido à centrifugação (INTERPRISE MINISPIN CENTRIFUGE) a 2000xg/3 minutos. Ao final, foi realizada a leitura em cubeta de vidro ótico (10 mm) a 695 nm em espectrofotômetro VIS (TECNAL B572). Durante as etapas do procedimento, a incidência direta de luz foi evitada. A capacidade antioxidativa total da fração lipídica foi expressa em equivalente de α-tocoferol.

4.2.5.9. Padronização do método do fosfomolibdênio para avaliação da capacidade antioxidativa total da fração lipídica (CATL)

Serviram de parâmetros para avaliar a adequação do método, a linearidade da curva de calibração, usando como padrão o α-tocoferol, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e recuperação (PIMENTEL; NETO, 1996; BARROS NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002; BRASIL, 2003; PEIXOTO SOBRINHO et al., 2008).

4.2.5.9.1. Linearidade da curva de calibração

Foi estabelecida com cinco concentrações cada, 0,001; 0,014; 0,035; 0,043; e 0,087 mg/mL), a partir da solução de α-tocoferol em etanol (1mg/ mL). Os resultados foram analisados por regressão linear simples, e os termos de qualidade de ajuste linear- coeficiente de determinação (mínimo aceitável R^2= 0,99),

coeficiente de correlação, a equação de regressão, o desvio-padrão e a normalidade dos resíduos – foram calculados (BARROS NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002; BRASIL, 2003).

4.2.5.9.2. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O LD é entendido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O LQ é a menor quantidade do analito em uma amostra, que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas. Os LD e LQ foram estimados (em mg/mL), considerando o desvio-padrão (DP) em relação ao coeficiente angular (IC) obtido pela linearidade, utilizando respectivamente as equações: LD= DP x 3/IC e LQ= DP x 10/IC (BRASIL, 2003).

4.2.5.9.3. Precisão

A precisão avalia a aproximação entre várias medidas efetuadas na mesma amostra. Usualmente, é expressa como desvio-padrão (DP), variância ou coeficiente de variação (CV) de diversas amostras. O CV é dado pela equação CV% = (DP/M) x100, na qual DP é o desvio padrão de cada concentração e M é a média de cada concentração (BRITO et al., 2003).

4.2.5.9.4. Recuperação (R)

Foi realizada com quatro amostras (n=4), em triplicata. O resultado foi obtido por meio da equação R (%) = (CTT - CTE / CTP) x 100, onde CTT compreendeu a concentração total de α-tocoferol (o encontrado na amostra + o padrão adicionado a ela), CTE a quantidade de α-tocoferol da amostra e CTP o teor de α-tocoferol do padrão (BRASIL, 2003).

4.3. Análise estatística dos dados

Foi usado o programa SAS (SAS Institute, 1997). Em relação à padronização do método do fosfomolibdênio, ao efeito do processamento sobre o tipo de ovo e diferentes tempos de estocagem do ovo, inicialmente as variâncias de cada variável de resposta, foram avaliadas quanto a sua homogeneidade pelo teste de Hartley. Em seguida, as variáveis de resposta tiveram as médias dos tratamentos testadas por meio do teste de F univariado (ANOVA) para medidas repetidas, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey. As variáveis que apresentaram valor-p menor que 0,05 no teste de Hartley, foram submetidas ao teste não-paramétrico de Kruscal-Wallis, para checar contrastes entre os tratamentos. Os valores-p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

Para checar o papel protetor dos antioxidantes na atomização de ovo líquido integral pasteurizado, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta (RSM) através de um delineamento experimental completo do tipo 2^3, com 2 replicatas no ponto central, totalizando 10 ensaios independentes (MONTGOMERY, 2000), como é mostrado na Tabela 3. As variáveis independentes adotadas foram o extrato de alecrim extrato de chá verde e o BHA, com os níveis (ppm) descritos na Tabela 4. Os níveis adotados foram baseados na recomendação da empresa fornecedora (DANISCO) dos antioxidantes naturais (alecrim e chá verde) e na legislação brasileira no caso do BHA.

Para avaliar o efeito combinado das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes (yi) empregou-se a metodologia de superfície de resposta, que pode ser genericamente escrita como: $yi = f(x_1, x_2, x_3)$. As médias dos dados experimentais, para as cinco variáveis de resposta, dos dez tratamentos, foram tratadas por análise de regressão linear múltipla, como emprego do programa SAS. A análise de variância, associada ao teste F, foi aplicada para testar a adequação dos modelos, a falta de ajuste em relação a 95% de confiança e para calcular o coeficiente de determinação (R^2). Os resultados experimentais foram ajustados ao modelo que melhor representou a correlação entre cada fator e a resposta avaliada, sendo que tal procedimento foi obtido pela estimação dos coeficientes de regressão. Para visualizar o efeito das variáveis independentes sobre as respostas avaliadas foram traçados gráficos tridimensionais.

A otimização da concentração da mistura de antioxidantes procedeu-se com o uso da função de desejabilidade, que seguiu a imposição computacional exaustiva nos pontos com respostas ótimas (DERRINGER; SUICH, 1980). A partir de uma nova combinação definida pelo programa estatístico como ótima, uma nova amostra de ovo líquido integral pasteurizado foi preparada, e a ela adiciona a combinação de antioxidantes e submetida aos mesmos protocolos experimentais para averiguar a adequabilidade dos modelos em seu poder preditivo e o valor previsto. O modelo matemático obtido no valor experimental foi submetido a duas metodologias estatísticas: i) teste t-Student pareado e ii) cálculo do erro absoluto residual usando a equação: Erro absoluto residual (%) = [(Valor experimental – Valor previsto)/Valor experimental] x 100, para então ser otimizada a concentração dos antioxidantes adotados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Padronização do método do fosfomolibdênio para avaliação da capacidade antioxidante total da fração lipídica do ovo

Considerando a presença de quantidades significativas de substâncias oxidáveis (ácidos graxos e colesterol) na fração lipídica do ovo, foi incluído no planejamento experimental conhecer a capacidade antioxidante exercida por componentes naturais presentes no ovo.

Em publicação relativamente recente, Singh e Singh (2008) apresentaram revisão sobre métodos de determinação da atividade antioxidante *in vitro.* Consideraram o método do fosfomolibdênio, idealizado por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), também aplicável à determinação de vitamina E, como sendo de baixo custo, reprodutível, não apresentar interferência com solventes e sem qualquer limitação.

Mohamed, Pineda e Aguilar (2007) usaram o método de Prieto, Pineda e Aguilar (1999) ajustando-o à determinação da capacidade antioxidante manifestada tanto por substâncias hidrossolúveis como lipossolúveis. No caso das lipossolúveis (extraídas previamente em hexano), a expressão final dos resultados é dada em termos de equivalentes de α-tocoferol (vitamina E). O método em questão foi usado em vários alimentos (milho e soja), mas não em relação ao ovo ou a produtos dele derivados, o que veio a requerer sua necessária padronização no presente trabalho.

O método do fosfomolibdênio baseia-se na redução do molibdênio VI [provido no reagente fosfomolibdato pelo $(NH4)_6Mo_70_{24}$] a molibdênio V, pela(s) substância(s) ativa(s), com formação de um produto de cor verde formado pelo complexo $Mo(V)+P0_4$, em pH ácido, com absorção máxima a 695 nm (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999; MOHAMED; PINEDA; AGUILAR, 2007). Originalmente o método, ao permitir sua utilização para quantificar a vitamina E (neste caso, usando temperatura de incubação de 37°C, ao em vez de 95°C), foi considerado uma alternativa válida para substituir a determinação da referida vitamina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

A linearidade da curva de calibração, o limite de detecção, o limite de quantificação, a recuperação e a precisão foram usados como parâmetros para padronização do método selecionado.

A curva média de calibração em 5 níveis de concentração (0,001; 0,014; 0,035; 0,043; 0,087 mg/ mL), análises em triplicata, resultou na equação de regressão y = 13,705x + 0,0808, sendo y a absorbância (nm) e x a concentração (mg de α-tocoferol/ mL), com um coeficiente de determinação R^2 = 0,9931, coeficiente de correlação r = 0,9965, desvio padrão residual de 0,047, além do gráfico de resíduos (Gráfico 5) não ter apresentado tendências. Assim, verificou-se a adequabilidade do modelo de regressão linear na modelagem dos resultados experimentais para determinação da capacidade antioxidativa total da fração lipídica (CATL) pelo método de fosfomolibdênio.

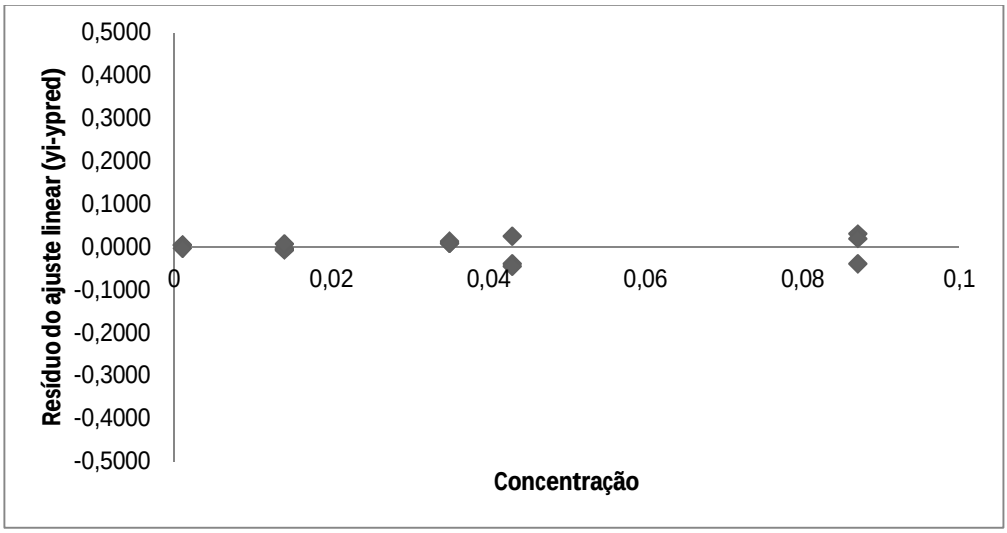


Gráfico 1 – Resíduos da curva de calibração da CATL

A precisão constatada não indicou qualquer dispersão ao redor da média, sendo que o valor máximo aceitável no caso seria de até ± 5%. A menor quantidade de α-tocoferol/ mL que pôde ser detectada foi de 0,005 mg (limite de detecção-LD) e a menor concentração quantificada de 0,017 mg (limite de quantificação-LQ). A

recuperação foi de 97,22 ± 10,00% relativa ao α-tocoferol adicionado à matriz, medindo a eficiência de sua extração.

Os parâmetros avaliados foram considerados plenamente adequados e concordantes com a literatura tomada como base (BRASIL, 2003).

A escolha do método do fosfomolibdênio, para a avaliação da capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) do ovo líquido integral, ovo líquido integral pasteurizado e ovo integral pasteurizado atomizado, foi devido principalmente à vinculação com o α-tocoferol, cujo aporte natural pode ser comprometido no caso do ovo submetido ao processamento térmico e/ou estocagem. Não foram encontrados relatos na literatura da aplicação do método do fosfomolibdênio para a avaliação da capacidade antioxidante total da fração lipídica do ovo e seus derivados.

A menor concentração quantificada expressa como limite de quantificação (LQ) do método padronizado (0,017mg/ mL), condiz com a ocorrência relatada em ovo líquido integral (fresco), de 0,97mg/100g (USDA, 2008), ou seja, o LQ constatado indica que o método tem sensibilidade suficiente para medir o α-tocoferol presente no ovo.

O método do fosfomolibdênio pode ser utilizado em análise de rotina no controle de qualidade do ovo, durante o processamento e/ou estocagem, já que os compostos responsáveis por essa característica estão associados à atividade antioxidante, com consequente preservação.

5.2. Efeitos da pasteurização e da atomização sobre a capacidade antioxidante e a estabilidade oxidativa da fração lipídica do ovo

Foram avaliados os efeitos dos processamentos de pasteurização e de atomização, medidos pelos lipídios totais (LP), capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e do 7-cetocolesterol (7-CETO), em ovo líquido integral, ovo líquido integral pasteurizado e ovo integral pasteurizado atomizado (Tabela 7). Os óxidos de colesterol 7α-hidroxicolesterol (7α-OH) e 7β-hidroxicolesterol (7β-OH), incluídos na investigação, não puderam ser quantificados por estarem abaixo dos limites de quantificação (1,03 x 10^{-7} e 2,30 x 10^{-7} µg/ g) correspondentes.

Tabela 7. Lipídios totais (LP), capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e 7-cetocolesterol (7-CETO) em ovo líquido integral (OLI), ovo líquido integral pasteurizado (OLIP) e ovo integral pasteurizado atomizado (OIPA)

Ovo	LP	CATL	TBARS	7-CETO
OLI	$7{,}90^{b}$± 0,68	$2{,}45^{a}$± 0,12	$0{,}00334^{b}$ ± 0,49	$8{,}39^{b}$ ± 1,48
OLIP	$8{,}03^{b}$± 0,59	$2{,}38^{a}$± 0,28	$0{,}00344^{b}$± 0,53	$10{,}15^{b}$ ± 1,53
OIPA	$39{,}64^{a}$ ± 0,33	$1{,}76^{b}$ ± 0,16	$0{,}00416^{a}$ ± 0,10	$12{,}87^{a}$ ± 2,18
p-valor*	0,48	0,06	0,008	0,63
p-valor#	<0,01	<0,001	0,003	0,002

Resultados médios (n=3)±desvio-padrão expressos em base seca. LP: g de lipídio/100g; CATL: equivalente em mg de α-tocoferol/g; TBARS: mg de dialdeído malônico /kg; 7-CETO = µg 7-cetolcolesterol/g. Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes (p< 0,05) de acordo com o teste de Tukey ou Kruscal-Wallis.*Valor-p para teste de homogeneidade de variâncias de Hartley (F-max); #Valor-p para a análise de variância univariada ou teste de Kruscal-Wallis.

Os resultados dos lipídios totais, CATL, TBARS e 7-CETO encontrados no ovo líquido integral (OLI) (controle) e no ovo líquido integral pasteurizado (OLIP) não diferiram significativamente (p>0,05) entre si, sugerindo não ter havido influência da pasteurização realizada em laboratório (65ºC/ 3 minutos). É evidente que os resultados observados não podem ser extrapolados diretamente em relação à uma pasteurização industrial do OLI. É necessário considerar as diferenças inerentes da

estrutura e escalas envolvidas. Mas esses resultados dão uma orientação mínima favorável nesse sentido.

Em oposição, a atomização do OLIP afetou a fração lipídica do produto. Reduziu de modo significativo a CATL em 28,16%, comparada ao controle (OLI), ao mesmo tempo em que elevou as TBARS em 124,55% e o 7-CETO em 153,40%, produtos secundários da oxidação de ácidos graxos e do colesterol, respectivamente. Neste caso é importante também considerar que em uma situação industrial o comprometimento do OIPA possa ser diferente e eventualmente maior. Neste caso também, é importante considerar que numa situação industrial o comprometimento possa ser diferente, e eventualmente maior (Tabela 7).

A atomização promove redução da umidade e consequente aumento da concentração dos demais componentes do ovo, como os lipídios (KITAHARA, 2004; MEDINA, 2009; ESCARABAJAL, 2011). Com a diminuição da água disponível há aumento da concentração de radicais livres, elevando a taxa de oxidação de ácidos graxos e de colesterol, favorecida pela temperatura empregada no processo (ANGELO, 1992).

De acordo com a literatura, a diminuição da proteção natural (proteínas, carotenóides, lipoproteínas, tocoferóis e fosfolipídios) (WAHLE; HOPPE; McINTOSH, 1993; GALOBART et al., 2001a; CABONI et al., 2005; FLOROU-PANERI et al., 2006; WENZEL; SEUSS–BAUM; SCHLICH, 2010) do ovo com o processamento poderá influenciar na estabilidade oxidativa do colesterol e ácidos graxos (KITAHARA, 2004; MEDINA, 2009).

Os lipídios do ovo fresco não são facilmente oxidados (WAHLE; HOPPE; MCINTOSH, 1993; CABONI et al., 2005), sendo a oxidação facilitada durante o processamento, especialmente quando envolve altas temperaturas, como na atomização.

Com o processamento feito em escala de laboratório, Wenzel, Seuss-Baum e Schlich (2010) verificaram que a pasteurização (61,5°C/ 3,5 minutos) da gema de ovo não levou a mudanças críticas no conteúdo de carotenóides (xantofilas), ao contrário da atomização e da liofilização, que causaram perdas, de 5,53 e 18,57%,

respectivamente, induzidas por uma desnaturação de proteínas e desestabilização da matriz celular.

Em condições laboratoriais idênticas às empregadas no presente trabalho, Escarabajal (2011) observou, opostamente, que a pasteurização e a atomização do ovo líquido integral não afetaram a estabilidade oxidativa do colesterol, quando avaliada por intermédio dos óxidos 7α-hidroxicolesterol, 7β-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol livres. Esta divergência sugere uma reavaliação sobre um eventual efeito ou não do processamento, na obtenção do ovo integral pasteurizado atomizado (OIPA) realizado em laboratório, podendo ser útil também nos casos de produção em escalas piloto e industrial.

Foi constatada por Medina (2009) uma redução significativa de 25% dos carotenóides totais em ovo líquido integral pasteurizado atomizado (OIPA) processado em escala industrial, sem que houvesse o comprometimento do colesterol, medido pelos óxidos livres como o 7-cetocolesterol, 7α-hidroxicolesterol, 7β-hidroxicolesterol e 25-hidroxicolesterol. Por sua vez, Caboni et al. (2005) observaram que a atomização industrial não afetou a composição de tocoferóis (α-tocoferol e γ-tocoferol). No entanto, o processamento provocou o surgimento da reação de Maillard, além da oxidação do colesterol, medida pelo 7-cetocolesterol, 7α-hidroxicolesterol, 7β-hidroxicolesterol, colesterol-5α,6α–epóxido, colesterol-5β,6β–epóxido, colestanotriol, 25-hidroxicolesterol e 20-hidroxicolesterol.

A operação de desugarização (retirada da glicose) do ovo antes da atomização o protege durante o aquecimento e estocagem, em relação à formação de compostos da reação de Maillard. Esses compostos resultam da condensação dos grupos carbonila, do açúcar redutor, e amino, da proteína (CABONI et al., 2005), que por sua vez são responsáveis principalmente pelo sabor e cor indesejáveis observados no ovo em pó (BERGQUIST, 1995). Entretanto, tais produtos, tendo atividade antioxidante, tornam o ovo atomizado mais estável durante a estocagem (SMITH; ALFAWAZ, 1995; ALAIZ; ZAMORA; HIDALGO, 1996; SHIZUCHI; HAYASE, 2003).

Segundo Galobart et al. (2001ab), o perfil lipídico do ovo influência a oxidação de ácidos graxos, indicada pelo aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em até 10 vezes, após a atomização industrial. Os resultados

da Tabela 7 não confirmam o fato, eventualmente pelo processamento ter sido realizado em escala de laboratório.

As concentrações de TBARS (mg de dialdeído malônico/kg) detectadas por Medina (2009), em amostras comerciais de ovo líquido integral pasteurizado (0,37mg) e de ovo integral pasteurizado atomizado (0,34 mg) superaram às encontradas no presente estudo (Tabela 7). O que deve estar relacionado às diferentes condições de atomização empregadas industrialmente, entre elas as temperaturas mais elevadas de atomização e diferentes amostras (LAI et al., 1995; GUARDIOLA et al., 1995, 1997), resultando no aumento das TBARS (THUNGMANEE; INTARAPICHET; THAIUDOM, 2007).

A liofilização e a atomização industriais, segundo Kitahara (2004), tiveram influência na oxidação do colesterol avaliada pelo somatório dos óxidos 7-cetocolesterol, 7α-hidroxicolesterol, 7β-hidroxicolesterol e 25-hidroxicolesterol. As concentrações dos óxidos analisados foram de 22,80, 75,19 e 101,9 µg/g, no ovo líquido integral, atomizado e liofilizado, respectivamente. Entretanto, o aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi mais efetivo na atomização (0,684 a 1,90 mg de dialdeído malônico/kg). Contudo, o processamento não influenciou significativamente o perfil de ácidos graxos.

Os resultados obtidos (Tabela 7) sugerem que a avaliação da CATL potencialmente possa ser usada no controle da atomização industrial do ovo integral previamente pasteurizado, antes e logo após o processo e, inclusive, durante a estocagem do produto.

A redução da CATL e a oxidação de ácidos graxos e de colesterol, provocadas pela atomização, poderiam ser neutralizadas, ou no mínimo diminuídas, pela adição prévia de α-tocoferol (aumentando o aporte natural) e/ou outros antioxidantes (isoladamente ou em associação), inclusive os sintéticos convencionais (BHA, BHT, TBHQ), não sendo dispensadas as condições adequadas de estocagem.

5.3. Efeito da estocagem sobre a estabilidade oxidativa dos ácidos graxos e a capacidade antioxidante do ovo integral pasteurizado atomizado

O ovo integral pasteurizado atomizado (OIPA) foi mantido em frascos de polietileno de alta densidade, impermeável ao oxigênio, sob atmosfera de nitrogênio, ao abrigo da luz e a 5±2ºC, condições essas consideradas ideais (HURR; PARK; JOO, 2007), e avaliado quanto à umidade (U), a capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em relação ao tempo de estocagem no período de 90 dias (Tabela 8).

Tabela 8. Umidade (U), capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do ovo integral pasteurizado atomizado mantido estocado em frasco de polietileno de alta densidade, sob atmosfera de nitrogênio, ao abrigo da luz, a 5±2ºC por até 90 dias

Estocagem (dias)	U	CATL	TBARS
1	3,60±0,54	1,97±0,38	0,00288±0,15
15	3,74±0,82	1,88±0,07	0,00245±0,28
30	3,12±0,81	1,79±0,40	0,00269±0,59
45	3,75±0,64	1,91±0,13	0,00240±0,64
60	3,96±0,67	2,00±0,07	0,00200±0,36
75	3,93±0,45	1,90±0,25	0,00254±0,37
90	4,30±0,41	1,73±0,45	0,00281±0,58
p-valor*	0,70	<0,001	<0,001
p-valor#	0,10	0,22	0,27

Resultados médios (n=3)±desvio-padrão expressos em base seca. U: g de umidade/100g; CATL: equivalente em mg de α-tocoferol/g; TBARS: mg de dialdeído malônico/kg. *Valor-p para teste de homogeneidade de variâncias de Hartley (F-max); #Valor-p para a análise de variância univariada ou teste de Kruscal-Wallis.

O ovo integral pasteurizado atomizado, estudado na Tabela 8, manteve-se inalterado em relação à hidratação, à capacidade antioxidante total de sua fração lipídica (CATL) e à estabilidade oxidativa de ácidos graxos. O controle da umidade serviu para indicar a impermeabilidade da embalagem ao vapor d´agua do meio exterior. O período de estocagem considerado é compatível com o prazo de validade

comercial do produto, o qual, ainda, pode ser estendido, se estudos posteriores assim o determinarem. A umidade encontra-se dentro da faixa relatada na literatura (1,2 a 5,20 %) (CABONI et al., 2005; OBARA; OBIEDZINSKI; KOLCZAK, 2006; MAZALLI; BRAGAGNOLO, 2007; MEDINA, 2009; ESCARABAJAL, 2011).

Foi verificada a existência de uma correlação linear decrescente entre a CATL e as TBARS (Tabela 8), avaliada pelo produto de Pearson (r), cujo valor de significância da regressão e a equação da reta constam também apresentados na Figura 11. A correlação inversa constatada aponta que, quanto menor era a capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) mais propício à oxidação estava o OIPA, expressada pelas TBARS, ou seja, o comprometimento da proteção natural do ovo incidiu na desestabilização de ácidos graxos. Escarabajal e Tenuta-Filho (2005) verificaram uma correlação crescente significativa ($p<0,05$) entre a oxidação dos ácidos graxos medida pelas TBARS e a oxidação do colesterol avaliada pelo 7-cetocolesterol, quando o ovo foi submetido à atomização industrial e estocado em laboratório por 90 dias, sob 25°C, no escuro.

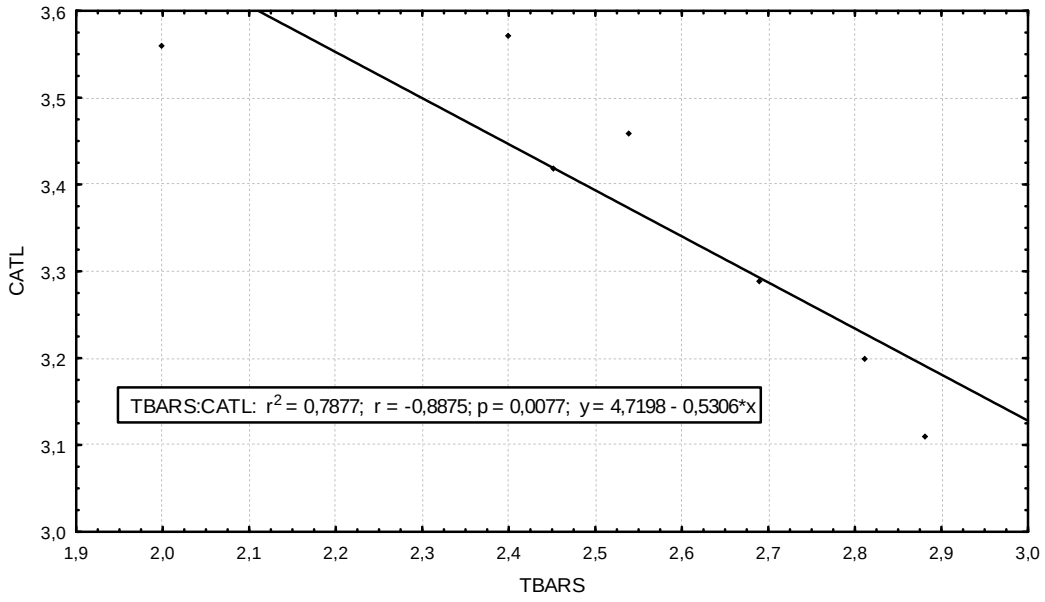


Figura 11. Correlação entre a capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) (equivalente em mg de α-tocoferol/g) e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (mg de dialdeído malônico/ Kg) observada no ovo integral pasteurizado atomizado (OIPA) durante a estocagem a 5±2ºC por até 90 dias

Os resultados da Tabela 8 sugerem que o comprometimento do produto durante o processamento, indicado na Tabela 7, deva ser equacionado. Nesse sentido, a adição previa de antioxidantes poderia ser uma opção de reforço da proteção, em concentração que garanta a estabilidade oxidativa e que possa ser útil também durante a estocagem.

As condições de estocagem usadas tendo sido efetivas na manutenção da CATL e na inibição da oxidação adicional de ácidos graxos (Tabela 8), como foi visto, supostamente foram úteis também em relação ao colesterol.

As condições e tempo de estocagem influenciam diretamente na formação de óxidos de colesterol em alimentos. Comprovam-se em muitos estudos que há formação reduzida de óxidos de colesterol na gema de ovo atomizada, quando estocada em baixas temperaturas (GUARDIOLA et al., 1995). No presente estudo, as condições de estocagem usadas são reconhecidas na literatura (HURR, PARK, JOO, 2007) como efetivas na inibição da oxidação do colesterol. A embalagem de polietileno não permitiu, aparentemente, a troca com o meio exterior, em relação ao vapor d´agua, evitando que o produto atomizado, que é higroscópico (DEMERTZIS; KONTOMINAS, 1988; PRITZKER, 1994) se hidratasse e favorecesse a oxidação.

A embalagem usada, sendo também aparentemente impermeável ao oxigênio (internamente em quantidade muito reduzida, pela substituição quase completa pelo nitrogênio), não teria permitido que o mesmo exercesse seu indesejável poder oxidante. Os fatores apontados, somados a não participação direta de luz e ao emprego de temperatura de refrigeração (5ºC), permitem que se leve em consideração a oportunidade de estocagem do produto atomizado, com a preocupação de uma inibição efetiva da oxidação da fração lipídica. Como se sabe, ao ovo atomizado disponível não é dispensado esse cuidado, ao menos no comércio local.

A literatura mostra que há o comprometimento de vitamina E e carotenóides, aumento das TBARS e oxidação do colesterol (WAHLE; HOPPE; MCINTOSH, 1993) quando o ovo é estocado à temperatura ambiente, com ligeira modificação desses compostos quando o ovo é mantido sob temperaturas mais baixas (-18ºC a 4°C) (GRUNE et al., 2001; WENZEL; SEUSS-BAUM; SCHLICH, 2010). Além disso, consta que a oxidação do colesterol foi muito evidente no ovo atomizado exposto à luz (FONTANA et al., 1993; HUR; PARK; JOO, 2007). As barreiras físicas, tais como

os materiais de embalagem, são capazes de inibir ou reduzir a permeação do ar atmosférico e luz, sem efeitos negativos (oxidação, formação de compostos de odor e sabor indesejáveis, etc) relativo aos alimentos e, consequentemente, minimizar a oxidação do colesterol (CHAN; GRAY; GOMAA, 1993).

Mazalli e Bragagnolo (2007), ao estocarem por 12 meses o ovo atomizado a 25°C, no escuro e sob vácuo, relataram que as quantidades de óxidos de colesterol (7-cetocolesterol, 7-α-hidroxicolesterol, 7-β-hidroxicolesterol, 5,6α-epoxicolesterol, e 5,6β-epoxicolesterol) aumentaram, sem que houvesse redução do colesterol. Os ácidos graxos poli-insaturados foram reduzidos, enquanto os níveis de monoinsaturados e lipídios totais permaneceram constantes.

Os mesmos autores (MAZALLI; BRAGAGNOLO, 2009), dando continuidade ao trabalho anterior, observaram que a concentração de 7-cetocolesterol foi maior na gema submetida à fritura e aumentou ao longo da estocagem (45 dias/escuro) quando feita a 25°C, em vez de 5°C. Não houve diferença entre os teores de colesterol e de vitamina E com os diferentes períodos de estocagem. Contudo, a concentração de vitamina E (10,15 a 11,43 mg) diminuiu com o tratamento térmico. Além disso, os ácidos graxos poli-insaturados, linolênico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico, foram reduzidos ao longo da estocagem, tanto a 5°C como a 25°C.

Medina (2009), ao estocar o ovo integral pasteurizado atomizado, durante 90 dias, à temperatura ambiente, em bolsa hermética de polietileno de baixa densidade, verificou o incremento da umidade de 2,92 a 4,98%. Atribuiu o fato à natureza levemente higroscópica do ovo em pó, em sintonia com relatos da literatura (DEREWIAKA; OBIEDZIN´SKI, 1988; PRITZKER, 1994). Ao mesmo tempo, houve aumento das TBARS (0,35 a 0,69 mg de dialdeído malônico /Kg), atribuído à forma de manuseio das amostras e à permeabilidade da embalagem em relação ao oxigênio e ao vapor dàgua, apontado anteriormente.

Deve se dada atenção especial ao processamento que possa prejudicar a composição do alimento, as características sensoriais e a formação de compostos tóxicos. Não havendo outra forma de processamento que acarrete efeitos negativos ao produto, o ideal é que se adotem fatores que os miniminizem ou impeça-os, como por exemplo, adição de antioxidantes, melhores condições de embalagem e estocagem. Como verificado no presente estudo, as condições de embalagem

adotadas foram primordiais para manter estável a oxidação lipídica e a proteção natural do ovo integral atomizado.

5.4. Efeitos da adição e concentração da mistura de antioxidantes sobre a estabilidade oxidativa lipídica do ovo integral pasteurizado atomizado

Foram avaliados os efeitos da adição e concentração dos antioxidantes extrato comercial de alecrim, extrato comercial de chá verde e BHA (realizada antes da atomização), sobre o ovo integral pasteurizado atomizado (OIPA), por meio da metodologia de superfície de resposta (RSM). A estabilidade oxidativa lipídica do OIPA foi avaliada pelas variáveis de resposta - capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), capacidade redutora pelo reativo Folin - Ciocalteau (CR-F), ácidos graxos livres (AGL) e substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233). Foram ensaiadas dez misturas dos antioxidantes mencionados, com monitoramento de um controle (sem adição de antioxidante) (Tabela 9).

Os resultados obtidos variaram consideravelmente, refletindo a influência das diferentes concentrações dos três antioxidantes usados sobre a estabilidade oxidativa lipídica do ovo integral pasteurizado atomizado, segundo a Tabela 9.

Nos ensaios 1, 2 e 7 a disponibilidade da CATL aumentou 147,26; 152,78 e 127,39%, respectivamente, em relação ao controle, enquanto no ensaio 9 houve redução de 37,04%, possibilitando que as TBARS ficassem reduzidas em 57,27%. O aumento da CATL sugere a participação da mistura dos antioxidantes adicionados e, a redução das TBARS, um sinal de proteção antioxidante.

Nos ensaios 5 e 7 ficaram evidentes aumentos de 179,10 e 190,91% das TBARS, respectivamente, em relação ao controle, caracterizando a oxidação de ácidos graxos. Essas ocorrências, contudo, não vieram acompanhadas do comprometimento perceptível da CATL correspondente disponível. A ineficiência dos antioxidantes envolvidos nos ensaios 5 e 7 poderiam justificar o aumento das TBARS.

Como na Tabela 9, Guardiola et al. (1997) investigou o efeito da adição do palmitato de ascorbila e o α-tocoferol, nas concentrações de 100 e 200 ppm, em ovo atomizado, e observou que os antioxidantes usados não conseguiram evitar a perda de ácidos graxos poli-insaturados e a oxidação do colesterol. Medina (2009)

verificou que a adição de 300 ppm de extrato comercial de tocoferóis não impediu o aumento das TBARS em ovo atomizado comercial.

A prevenção da oxidação de ácidos graxos pelo uso de antioxidantes é frequentemente utilizada na indústria de alimentos (ALLEN; HAMILTON, 1983; NAMIKI, 1990; SIMIC; JAVANOVIC, 1994; GALOBART et al., 2001a, 2001b; LAROSA, 2011; BERTOLIN et al., 2010; 2011). Entretanto, os antioxidantes não melhoram a qualidade comprometida pela oxidação pré-existente no produto, mas podem diminuir a concentração de oxigênio, interceptar o oxigênio singlete, decompor os produtos primários da oxidação em espécies não radicais e quebrar cadeias prevenindo a propagação da reação de captura do hidrogênio (MELO; GUERRA, 2002; BERTOLIN et al., 2011).

Tabela 9. Efeitos da adição e concentração das misturas de antioxidantes (Alecrim/ Chá verde/BHA/) ao ovo integral pasteurizado atomizado avaliados pela capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), capacidade redutora pelo reativo de Folin - Ciocalteau (CR-F), ácidos graxos livres (AGL) e substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233)

	Variáveis independentes			Variáveis de resposta[1]				
Ensaios	**Alecrim**	**Chá verde**	**BHA**	**CATL**	**TBARS**	**CR-F**	**AGL**	**AS-233**
1	-1	-1	-1	3,306^{a}	0,00127^{c}	0,0030^{cd}	3,863^{bc}	2,883^{ab}
2	-1	-1	1	3,430^{a}	0,00088^{de}	0,0028^{def}	3,147^{c}	2,407^{abc}
3	-1	1	-1	2,420^{bc}	0,00126^{cd}	0,0039^{b}	5,663^{a}	2,863^{ab}
4	-1	1	1	1,879^{cde}	0,00167^{b}	0,0029^{cde}	3,043^{c}	1,210^{c}
5	1	-1	-1	1,706^{de}	0,00197^{ab}	0,0025^{defg}	5,003^{ab}	1,570^{bc}
6	1	-1	1	1,959^{cde}	0,00080^{ef}	0,0021^{g}	3,897^{bc}	1,587^{bc}
7	1	1	-1	2,860^{ab}	0,00210^{a}	0,0052^{a}	3,413^{c}	1,743^{bc}
8	1	1	1	2,114^{cde}	0,00097^{cde}	0,0025^{defg}	5,740^{a}	1,395^{c}
9	0	0	0	1,542^{e}	0,00047^{f}	0,0034^{bc}	3,760^{bc}	1,930^{bc}
10	0	0	0	1,680^{de}	0,00047^{f}	0,0023^{fg}	3,820^{bc}	2,560^{abc}
Controle negativo (sem antioxidantes)				2,245^{cd}	0,00110^{cde}	0,0024^{efg}	3,483^{c}	2,963^{a}
Desvio padrão conjunto				0,653	0,00054	0,0009	0,991	0,00054
p-valor*				0,0695	0,3422	0,8266	0,4186	0,3422
p-valor#				<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Concentrações dos antioxidantes: 200 ppm (-1) – 600 ppm (0) – 1000 ppm (1) alecrim; 100 ppm (-1) – 300 ppm (0) – 500 ppm (1) chá verde; 100 ppm (-1) – 150 ppm (0) – 200 ppm (1) BHA. [1]Resultados médios (n=3) expressos em base seca. Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes ($p<0,05$) de acordo com o teste de Tukey ou Kruscal-Wallis. CATL: equivalente em mg de α-tocoferol/g; TBARS: mg de dialdeído malônico/ kg; CR-F: mg de ácido gálico/g; AGL: porcentagem de ácido oléico/g lipídio; AS-233: equivalente em µg 7-cetocolesterol/ mg lipídio.* Valor-p para teste de homogeneidade de variâncias de Hartley (F-max); #Valor-p para a análise de variância univariada ou teste de Kruscal-Wallis.

A capacidade redutora pelo reativo de Folin – Ciocalteau (CR-F) (Tabela 9) foi maior no ensaio 7, podendo ter havido correlação com uma maior concentração de antioxidantes naturais, alecrim (1000 ppm) e chá verde (500 ppm), que são fontes reconhecidas de compostos fenólicos responsáveis por tal característica (MORAIS et al., 2009; AFONSO; SANTANA; MANCINI-FILHO, 2010) e uma menor concentração do BHA (100ppm).

Os compostos fenólicos têm sido muito estudados devido à sua influência na qualidade dos alimentos pela inibição da peroxidação lipídica (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Assim, diversos extratos de ervas como alecrim, coentro, sálvia, tomilho e manjericão têm sido investigados devido o seu poder antioxidante, que é atribuído ao seu conteúdo de compostos fenólicos (ANGELO; JORGE, 2007). Além dos antioxidantes naturais adicionados ao ovo, segundo Hughes (1973) e Merluzzi et al. (2000), os compostos fenólicos encontrados no ovo podem provir da dieta das aves, pela possibilidade da gema incorporar esses compostos.

A quantidade dos ácidos graxos livres (AGL) verificados nos ensaios 3, 5 e 8 (Tabela 9) aumentaram em 162,50; 143,64 e 164,80% respectivamente, em relação ao controle. Esse fato sugere que a combinação dos antioxidantes nas concentrações empregadas não foram efetivas para minimizar a hidrólise dos lipídios produzindo AGL.

Tanto na ausência de antioxidantes, como se deu no controle, contendo 3,48 % ácido oléico/g lipídio, como na presença dos mesmos nos ensaios 1 a 10 com concentrações de 3,043 a 5,76% ácido oléico/g lipídio, houve significativo aumento dos AGL em relação ao encontrado no ovo líquido integral pasteurizado não atomizado, o qual continha 1,45% ácido oléico/g lipídio.

A decomposição acelerada dos lipídios quando submetidos ao aquecimento (NAWAR, 2000), como ocorreu na atomização, poderia justificar o aumento de AGL. Adicionalmente, o processo oxidativo lipídico é quase sempre acompanhado pela formação de AGL.

Medina (2009) relatou a ocorrência de AGL expressada em termos de 2,93% ácido oléico/g lipídio em ovo líquido integral pasteurizado industrial, valor este menor que o constatado na Tabela 9, de 3,483% de ácido oléico/g lipídio (controle). Com a atomização (industrial) do ovo líquido integral pasteurizado, Medina (2009) constatou

uma redução de AGL de 73,5%. A redução observada foi associada à volatilização de ácidos graxos e/ou oxidação com posterior conversão em outros produtos (TOMPKINS; PERKINS, 2000).

De modo geral, a oxidação dos ácidos graxos ocorre mais rapidamente com a elevação da temperatura, devido à redução parcial da solubilidade do oxigênio entre a água e os lipídios. Os ácidos graxos oxidam-se mais rapidamente ainda na forma livre do que na conjugada na molécula de acilglicerol (NAWAR, 2000; MEDINA, 2009).

Segundo Cherian, Holsonbake e Goeger (2002), a composição de ácidos graxos do ovo branco comercial gira em torno de 35,2%, 45,8% e 18,9% de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, respectivamente, com elevada concentração de ácido oleico (42,6%) na gema.

Os ensaios 4 e 8 exibiram redução das substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233), entre 52,92 a 59,16 %, em relação ao controle, pressuposta pela ação dos antioxidantes envolvidos. As substâncias com absorções máximas a 233 nm (com é o caso do 7-cetocolesterol), ou parcial (não identificadas no presente trabalho) (CHEN, CHEN, 1994), foram quantificadas como AS-233 e expressas em equivalentes de 7-cetocolesterol. Como já apontado, o 7-cetocolesterol é considerado o óxido mais frequentemente encontrado como produto da oxidação do colesterol, sendo proposto que a sua ocorrência sirva para caracterizar tal evento (Tabela 9).

Relacionando a concentração das AS-233, de 1,95 equivalente em µg 7-cetocolesterol/ mg de lipídio, encontrada no ovo líquido integral pasteurizado, não atomizado, com o ovo integral pasteurizado atomizado (controle; Tabela 9), de 2,963 equivalente em µg 7-cetocolesterol/ mg de lipídio, foi 51,95% maior, fica então a sugestão de ter havido oxidação do colesterol provocada pela atomização.

A adição dos antioxidantes butilato de hidroxianisol (BHA), butilato de hidroxitolueno (BHT), galato de propila, palmitato de ascorbila, mistura de tocoferóis, *terc*-butil hidroquinona (TBHQ), óleo resina de alecrim e extrato de alecrim, ao ovo, antes ou após a atomização, não foi eficiente para reduzir e/ou erradicar completamente a oxidação do colesterol. A possibilidade de volatilização dos antioxidantes durante a atomização foi considerada como fator de insucesso

(MORGAN; ARMSTRONGAN, 1987; HUBER; PIKE; HUBER, 1995; LAI et al., 1995; MEDINA, 2009; ESCARABAJAL, 2011).

Como visualizado na Tabela 7, com o aumento da oxidação do colesterol com a atomização, a baixa eficiência dos antioxidantes (Tabela 9) relativa ao ovo atomizado não está relacionada só às altas temperaturas, mas também à elevada área de superfície do produto e à presença de oxigênio que, além de promoverem a volatilização dos antioxidantes, provocam à auto-oxidação lipídica (MAERKER, 1987; GUARDIOLA et al., 1995; CABONI et al., 2005; HUR; PARK; JOO, 2007), com significativa redução da proteção naturalmente conferida pelas proteínas (fosvitina, da gema, e conalbumina, da clara) (FLOROU-PANERI et al., 2006), carotenóides (especialmente luteína e zeaxantina), lipoproteínas, tocoferóis e fosfolipídios (WAHLE; HOPPE; MCINTOSH, 1993; GALOBART et al., 2001a; CABONI et al., 2005; WENZEL; SEUSS –BAUM; SCHLICH, 2010).

A oxidação lipídica não pode ser estimada apenas por simples ensaios *in vitro*. No entanto, alguns compostos mostraram uma alta correlação entre os seus efeitos antioxidantes, quando aplicados diretamente no alimentos e quando avaliados por metodologias *in vitro* (CAPITANI et. al., 2009). Além disso, o comportamento dos antioxidantes em mistura pode ser diferente daquele quando o antioxidante é testado individualmente (ANGELO; JORGE, 2008; CAPITANI et. al., 2009).

A influência das variáveis independentes (Alecrim/Chá verde/ BHA) sobre as variáveis de respostas (CATL, TBARS, CR-F, AGL e AS-233), relativas ao do ovo integral pasteurizado atomizado, como consta na Tabela 9, é observada na Tabela 10, apoiada no delineamento experimental completo do tipo 2^3, adotado pelo coeficiente de regressão significativo ($p<0,05$), equação de regressão, valor de p da regressão, coeficiente de determinação (R^2) e valor de p (falta de ajuste) do modelo matemático.

Tabela 10. Análises de regressão dos resultados contidos na Tabela 9, referentes à capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), capacidade redutora pelo reativo de Folin – Ciocalteau (CR-F), ácidos graxos livres (AGL) e substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233)

Variável de resposta	Equação de regressão	p-valor (regressão)	R^2 (%)	p-valor (falta de ajuste)
CATL	$y = 2,2896 + 0,4683X_2*X_3$	0,0085	41,23	0,1249
TBARS	Nenhum coeficiente do modelo de regressão foi significativo ($p < 0,05$)	0,01	NA	0,2978
CR-F	Nenhum coeficiente do modelo de regressão foi significativo ($p < 0,05$)	0,0494	NA	0,7068
AGL	$Y= 4,135 – 0,2646X_1 + 0,2921X_2 + 0,2437X_3 + 0,1912X_1*X_3 + 0,5696X_1*X_2 + 0,6671X_1*X_2*X_3$	0,002	93,59	0,0567
AS-233	$y = 2,014 – 0,3077X_1 - 0,3835X_2$	0,0444	63,74	0,6930

X_1 = BHA; X_2 = Alecrim; X_3 = Chá verde. R^2= Coeficiente de determinação. NA= Não aplicável. CATL: equivalente em mg de α-tocoferol/ g; TBARS: mg de dialdeído malônico/kg; CR-F: mg de ácido gálico/g; AGL: porcentagem de ácido oléico/g lipídio; AS-233: equivalente em µg 7-cetocolesterol/ mg lipídio.

Pela equação de regressão (Tabela 10) pode-se observar que apenas o chá verde e alecrim influenciaram a CATL, ou seja, a interação desses antioxidantes aumenta significativamente a CATL, mas apesar de apresentar coeficiente do modelo de regressão e valor de p (regressão) significativos ($p<0,05$) e falta de ajuste não significativo ($p>0,05$), o modelo matemático tem baixo poder de explicação ($R^2<$ 60%), por isso não pode ser usado para fins preditivos.

Segundo a Tabela 10, para as TBARS e CR-F os modelos matemáticos não mostraram ser apropriados para descrever o efeito da mistura dos antioxidantes em ovo integral pasteurizado atomizado, usando as condições experimentais adotadas no presente estudo, uma vez que os coeficientes do modelo de regressão não foram significativos ($p<0,05$), além dos coeficientes de determinação (R^2) estarem próximos à nulidade. Assim, os resultados indicam que nenhuma variável independente adotada (concentrações e tipo de antioxidantes) mostrou ter

significância na diminuição de TBARS e no aumento da CR-F do ovo integral pasteurizado atomizado. Os modelos matemáticos propostos para TBARS e CR-F não podem, portanto, ser usados para fins preditivos.

A equação de regressão mostra que os três antioxidantes adicionados ao ovo líquido integral pasteurizado influenciaram o aumento dos ácidos graxos livres, sendo que o BHA, isoladamente reduz, e o alecrim e chá verde aumentam significativamente essa resposta. Além disso, a equação do modelo de regressão demonstra que somente o BHA e o alecrim afetaram as AS-233, reduzindo significativamente sua formação (Tabela 10).

Os resultados experimentais mostraram que a metodologia de superfície de resposta foi adequada para descrever a formação de AGL e AS-233 durante a atomização de ovo líquido integral pasteurizado, uma vez que o modelo matemático proposto foi significativo (p de regressão<0,05), com falta de ajuste não significativo (p>0,05), e explicaram pelo modelo matemático (R^2), respectivamente, 93,59 e 63,74% da variabilidade dos resultados (Tabela 10), assim, podem ser usados para fins preditivos.

A RSM nem sempre é utilizada com sucesso para descrever resultados experimentais, ou seja, nem sempre se tem valores R^2 altos ou significância no modelo matemático (PAUCAR-MENACHO et al., 2008; OMWAMBA; HU, 2009; GRANATO et al., 2010; HOSSAIN et al., 2010; SAHA et. al, 2011). Isso é bastante comum, pois nem sempre é possível, por exemplo, colocar reações bioquímicas em uma equação matemática, já que muitos outros fatores, além dos testados, podem influenciar significativamente a resposta experimental.

Na Figura 12 encontram-se os resultados referentes à superfície de resposta da capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) do ovo integral pasteurizado atomizado, em função das concentrações adicionadas de alecrim e chá verde. Foi observado que a CATL depende da concentração dos antioxidantes, ou seja, quanto menor a concentração dos antioxidantes, maior a CATL do ovo integral pasteurizado atomizado. Em maiores concentrações, o alecrim e o chá verde exerceram efeito pró-oxidante.

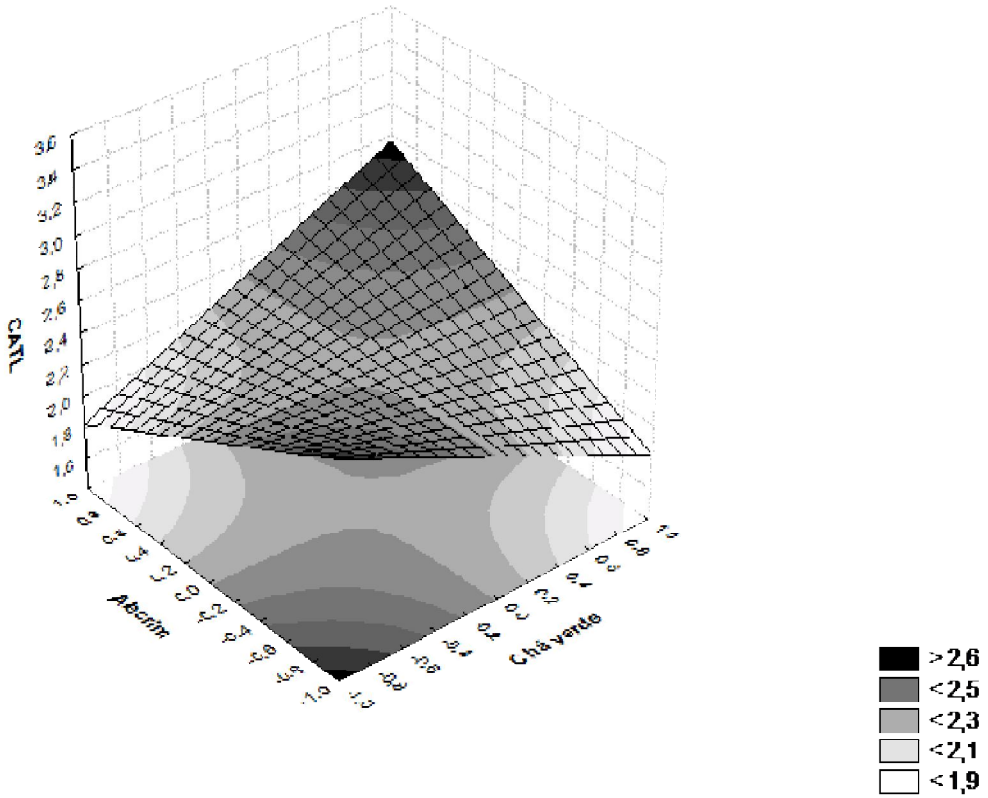


Figura 12. Superfície de resposta da capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) (equivalente em mg de α-tocoferol/g) do ovo integral pasteurizado atomizado, em função da concentração adicionada de alecrim e chá verde

Chu e Hsu (1999), estudando o efeito de fosfolipídios (1500 ppm), palmitato de ascorbila (100 ppm), alecrim (1000 ppm), tocoferol (1000 ppm) e catequina (1000 ppm) sobre a estabilidade oxidativa do óleo de amendoim, verificaram através da RSM que entre esses antioxidantes, a catequina sozinha ou em mistura com fosfolipídios, alecrim e tocoferol aumentou significativamente a estabilidade do produto em relação ao controle, sendo seguida por fosfolipídio, alecrim e tocoferol. O palmitato de ascorbila não apresentou resultado significativo.

McCarthy et al. (2001a,b) constataram que as catequinas do chá verde demonstraram ação sinergística positiva na redução da oxidação lipídica em hambúrguer de carne de porco, cru e cozido, quando combinados com extratos de alecrim e sálvia, em níveis inferiores a 500ppm. A literatura mostra que os polifenóis

do chá verde interagiram com o α-tocoferol e com a vitamina C, inibindo a peroxidação de ácidos graxos (DAI; CHEN; ZHOU, 2008).

Na Figura 13 encontram-se os resultados referentes à superfície de resposta dos ácidos graxos livres (AGL) do ovo integral pasteurizado atomizado, em função da concentração adicionada de chá verde e BHA. O chá verde e o BHA exerceram influência sobre a formação de AGL. Quanto menor a concentração dos antioxidantes, maior a formação dos ácidos graxos livres.

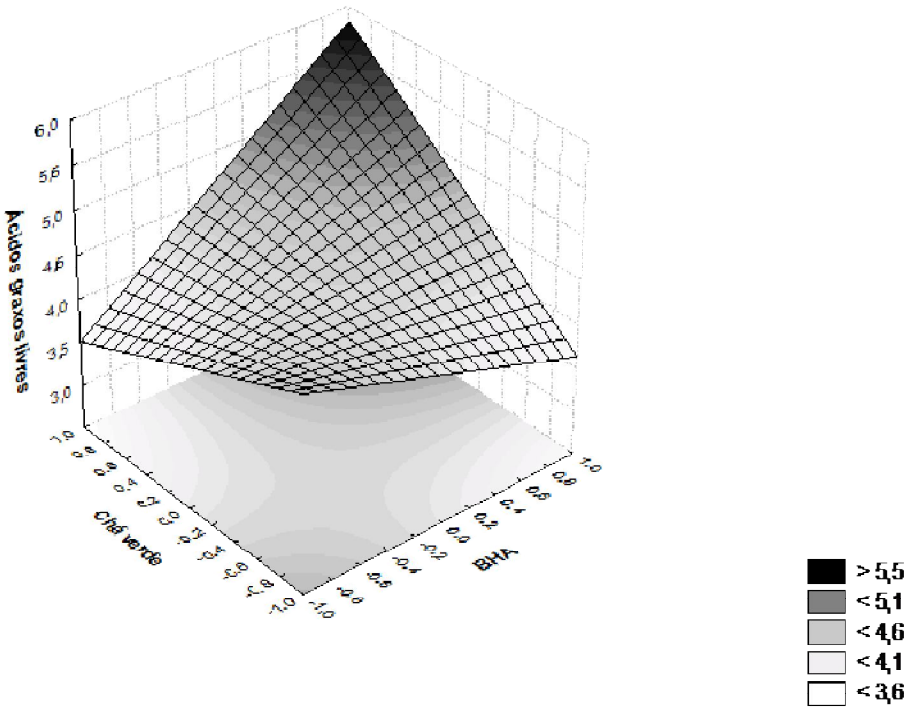


Figura 13. Superfície de resposta dos ácidos graxos livres (AGL: % ácido oléico/g lipídio) do ovo integral pasteurizado atomizado, em função da concentração adicionada de chá verde e BHA

Mildner-Szkudlarz et al. (2009) adicionaram extrato de chá verde (20/100/1000 ppm) e BHA (20 ppm) individualmente em biscoitos. Foi constado que ambos os antioxidantes reduziram claramente a oxidação de ácidos graxos, inibindo a decomposição dos monoinsaturados e poli-insaturados. A concentração de 1000ppm de chá verde resultou num melhor efeito sobre a inibição da formação de hidroperóxidos, em torno de 47 a 73%, enquanto o BHA inibiu, de 16 a 60%.

Na Figura 14 encontram-se os resultados referentes à superfície de resposta dos ácidos graxos livres (AGL) do ovo integral pasteurizado atomizado, em função da concentração adicionada de alecrim e BHA. Quanto menor a concentração dos antioxidantes, maior a formação dos ácidos graxos livres.

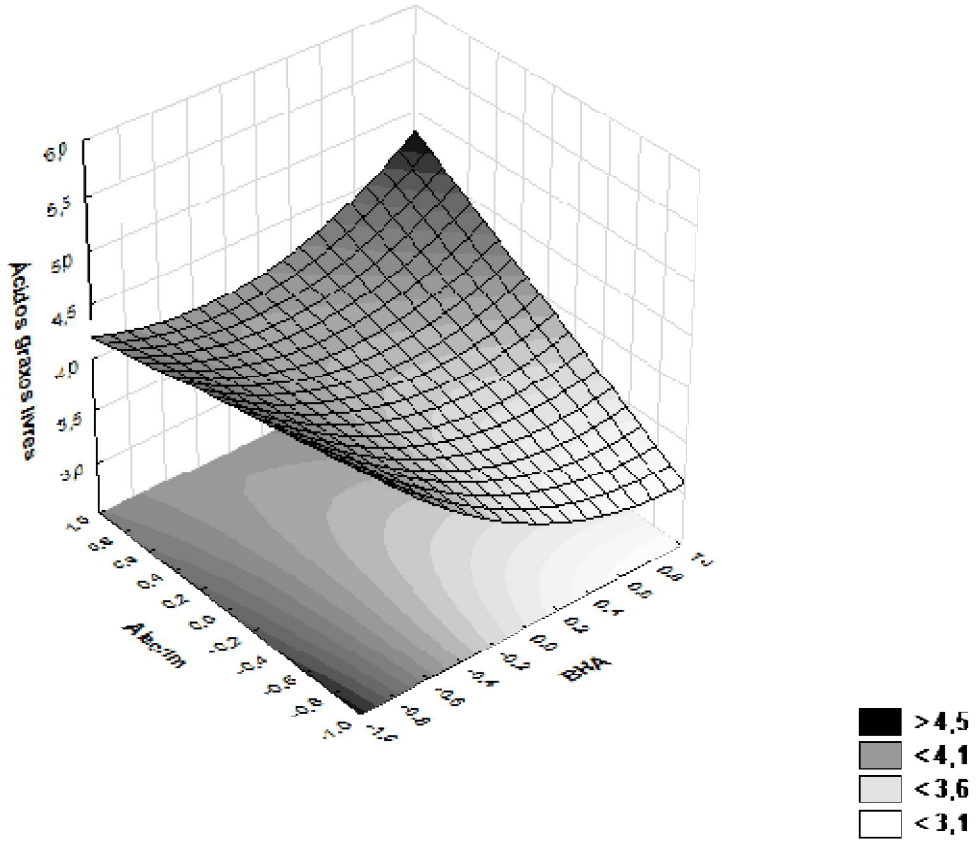


Figura 14. Superfície de resposta dos ácidos graxos livres (AGL: % ácido oléico/g lipídio) do ovo integral pasteurizado atomizado, em função da concentração adicionada de alecrim e BHA

Medina (2009) não constatou influência da adição de tocoferóis (300 ppm) na concentração de ácidos graxos livres do ovo atomizado.

Na Figura 15 encontra-se a superfície de resposta das substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) do ovo integral pasteurizado atomizado, em função da concentração adicionada de alecrim e BHA. O alecrim e o BHA exerceram influência sobre as AS-233. Quanto maior foi à concentração dos antioxidantes menor a formação das AS-233.

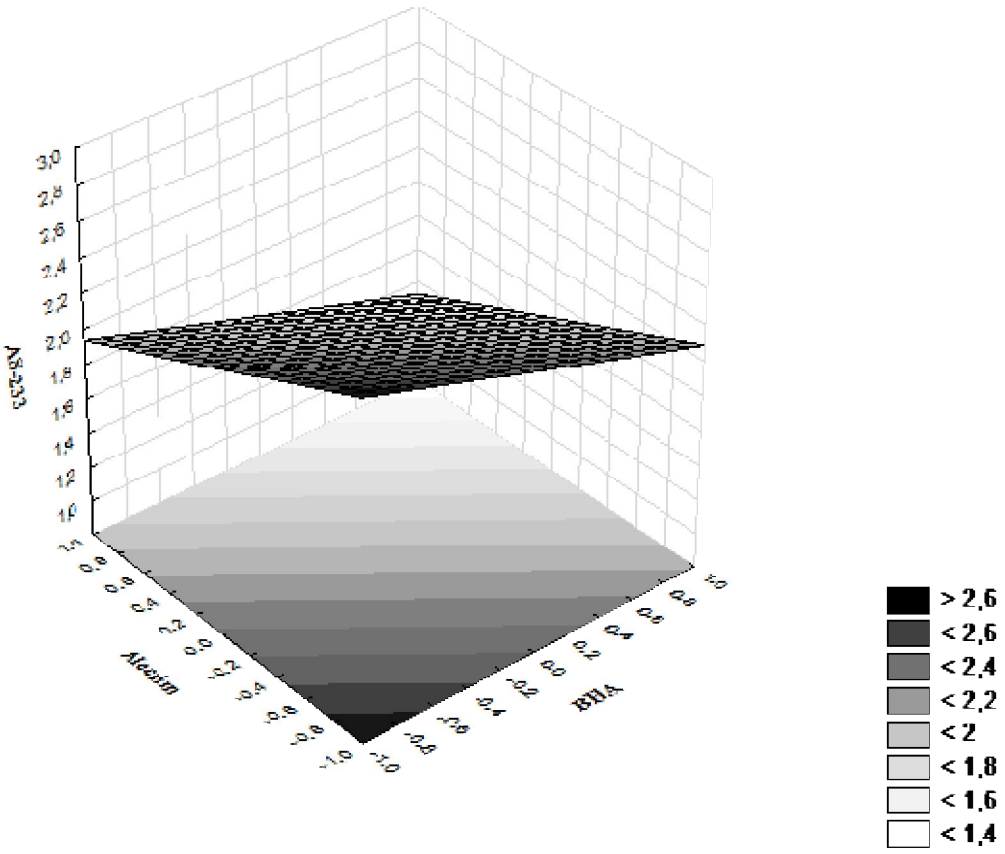


Figura 15. Superfície de resposta das substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) (equivalente em µg 7-cetocolesterol/ mg lipídio) do ovo integral pasteurizado atomizado, em função da concentração adicionada de alecrim e BHA

Rankin e Pike (1993) avaliaram a eficiência de antioxidantes como, oleoresina de alecrim, miricetina, quercitina, isômeros de tocoferóis (α, β e γ), mistura de isômeros de tocoferóis e BHA, em relação à oxidação do colesterol. Somente os isômeros de tocoferol promoveram efetivo atraso da autoxidação do colesterol e, consequentemente, retardou a formação dos óxidos de colesterol.

A literatura indica como antioxidantes mais adequados para aumentar a estabilidade oxidativa de gordura animal, o ácido caféico e o extrato metanólico de alecrim, com efeito superior ao BHT e BHA, respectivamente (RAMALHO; JORGE, 2006).

Lai et al. (1995) observaram que houve redução dos óxidos de colesterol no ovo integral atomizado na presença de TBHQ (200 ppm) e óleo essencial de alecrim (500 e 1000ppm) em relação ao controle (sem antioxidantes).

5.5. Otimização das concentrações de antioxidantes pelo modelo matemático proposto pela Metodologia de superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta (RSM) foi empregada no presente estudo por ser capaz de avaliar os efeitos de múltiplos fatores e suas interações, em uma ou mais variáveis de resposta. Pode ter em conta a possível inter-relação entre as variáveis do teste, enquanto minimiza o número de experimentos (ANTONIO et al., 2006; TORALLES et al., 2010; SAHA et al., 2011). A RSM é uma forma eficaz do método estatístico que é útil para modelação matemática (WU et al., 2012), obtendo-se modelos preditivos em função das variáveis independentes e as variáveis de resposta (MOURA et al., 2007). Pode também ser efetivamente usada como uma ferramenta para encontrar a combinação das variáveis independentes que produza uma resposta ótima (SAHA et al., 2011).

Tendo como base os resultados obtidos nas Tabelas 9 e 10, a otimização visando à inibição e/ou diminuição na formação das substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) mostrou estatisticamente que a função de desejabilidade total foi de 0,59 e o sistema antioxidante proposto pela RSM de 150 ppm de BHA, 600 ppm de alecrim e 300 ppm de chá verde, o que corresponde aos ensaios 9 e 10 do experimento realizado (Tabela 9). Seria essa a composição ótima dos antioxidantes para diminuir a formação das AS-233 no ovo integral pasteurizado atomizado. O valor médio previsto pelo modelo matemático para as AS-233 foi de 2,015 equivalente em µg 7-cetocolesterol/ mg de lipídio. A partir disso, uma nova amostra (ovo líquido integral pasteurizado) contendo os valores mencionados de cada antioxidante foi formulada e submetida aos mesmos protocolos experimentais, para averiguar a adequabilidade dos modelos em seu poder preditivo.

O resultado médio experimental obtido de 2,09 ± 0,29 equivalente em µg 7-cetocolesterol/ mg de lipídio. Sendo assim, o erro absoluto residual entre os valores previstos e os experimentais foram calculados [Erro absoluto residual (%) = (Valor experimental – Valor previsto/Valor experimental) * 100], resultando em 3,588%, e a comparação pareada usando o teste *t*-Student entre o valor experimental e o valor teórico previsto pelo modelo matemático de formação das substâncias absorvidas a

233 nm (AS-233) acusou um valor-p (0,7022) não significativo, aceitando, assim, a hipótese de nulidade, que evidencia a igualdade de médias entre o valor previsto pelo modelo matemático oriundo da RSM e a média de um experimento independente, usando as mesmas condições experimentais.

Portanto, o modelo proposto para as substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) pode ser usado para fins preditivos. Embora o modelo matemático obtido relativo aos ácidos graxos livres (AGL) pudesse ser usado para fins preditivos, à opção de não utilizá-lo na otimização, decorreu do fato de tais compostos não serem propriamente produtos gerados no processo oxidativo lipídico, ainda que sejam mais susceptíveis à oxidação por estarem na forma livre.

A RSM foi determinante para se constatar com precisão aceitável a influência das diferentes concentrações dos antioxidantes adicionados, com o objetivo de manter a estabilidade oxidativa do ovo submetido à atomização e posteriormente estocado sob condições consideradas ideais. Através dela chegou-se a um sistema antioxidante considerado ótimo para inibir e/ou diminuir a formação das substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233).

5.6. Efeitos da adição de antioxidantes e das condições de estocagem sobre a estabilidade oxidativa lipídica do ovo integral pasteurizado atomizado

Ao ovo integral pasteurizado foi adicionado à mistura dos antioxidantes alecrim, chá verde e BHA, nas concentrações otimizadas de 600, 300 e 150ppm, respectivamente (Tabela 6), antes da atomização. Em seguida, o produto foi mantido em frasco de polietileno de alta densidade, impermeável ao oxigênio, sob atmosfera de nitrogênio, ao abrigo da luz e nas temperaturas de 5±2°C e 25±2°C, por até 90 dias, e avaliado quanto à umidade, capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) e 7-cetocolesterol (Tabelas 11, 12, 13 e 14). Os óxidos de colesterol 7α-hidroxicolesterol (7α-OH) e 7β-hidroxicolesterol (7β-OH), incluídos na investigação, não puderam ser quantificados por estarem abaixo dos limites de quantificação (1,03 x 10^{-7} e 2,30 x 10^{-7} µg/ g) correspondentes.

Tabela 11. Umidade (U), capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) e 7-cetocolesterol (7-CETO) do ovo integral pasteurizado atomizado sem antioxidantes (controle) e com a mistura de antioxidantes otimizada (AA), estocado por até 90 dias em embalagem impermeável ao oxigênio, sob atmosfera de nitrogênio, ao abrigo da luz e a 5±2ºC

Amostras	Dia	U	CATL	AS-233	7-CETO
Controle 5°C	1	$2,93^{b}$±0,17	$2,29^{ab}$±0,10	$3,57^{a}$±0,37	$0,0212^{ab}$±0,0002
AA 5°C	1	$3,01^{b}$±0,27	$1,92^{b}$±0,27	$1,77^{b}$±0,21	$0,033^{a}$±0,0006
Controle 5°C	30	$2,89^{b}$±0,27	$2,38^{ab}$±0,49	$3,38^{a}$±0,57	$0,0259^{ab}$±0,0085
AA 5°C	30	$2,18^{b}$±0,10	$2,31^{ab}$±0,17	$1,23^{b}$±0,14	$0,0200^{ab}$±0,0005
Controle 5°C	60	$3,19^{b}$±0,27	$2,40^{ab}$±0,05	$1,31^{b}$±0,14	$0,0198^{ab}$±0,0004
AA 5°C	60	$2,08^{bc}$±0,48	$2,15^{b}$±0,17	$1,43^{b}$±0,13	$0,0190^{ab}$±0,0010
Controle 5°C	90	$4,08^{ab}$±0,16	$1,88^{b}$ ±0,08	$1,36^{b}$±0,17	$0,0163^{b}$±0,0003
AA 5°C	90	$2,93^{b}$±0,11	$2,91^{ab}$±0,13	$1,41^{b}$±0,25	$0,0158^{b}$±0,0009
p-valor*		0,85	0,10	0,39	<0,001
p-valor#		<0,001	0,001	<0,001	0,001

Resultados médios (n=3)±desvio-padrão expressos em base seca. U: g de umidade/100g; CATL: equivalente em mg de α-tocoferol/ g; AS-233: equivalente em µg 7-cetocolesterol/ mg lipídio; 7-CETO: µg 7-cetocolesterol/ mg lipídio. Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes (p< 0,05), de acordo com o teste de Tukey ou Kruscal-Wallis. *Valor-p para teste de homogeneidade de variâncias de Hartley (F-max); #Valor-p para a análise de variância univariada ou teste de Kruscal-Wallis

De acordo com a Tabela 11, a adição de antioxidantes exerceu efeito somente sobre as substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233), que foram reduzidas após 1 e 30 dias de estocagem. A presença dos antioxidantes e as condições de estocagem adotadas, a 5°C, foram suficientes para manter estáveis os níveis de umidade, a capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) e 7-cetocolesterol. A redução das AS-233 pode estar relacionada com temperatura (5°C), que não favoreceu a formação das mesmas, nos tempos indicados.

Como na Tabela 11, a literatura indica que a estocagem sob refrigeração (4°C) em embalagens a vácuo e ao abrigo da luz preveniram a oxidação do colesterol e consequentemente a formação de óxidos de colesterol em ovo

atomizado (NOUROOZ-ZADEH; APPELQVIST, 1987; GUARDIOLA et al., 1994; ADDIS et al., 1996; CABONI et al., 2005). As condições de atomização em escala industrial exercem efeito sobre a oxidação do colesterol (0,084 µg 7-cetocolesterol/ mg lipídio) (ESCARABAJAL; TENUTA-FILHO, 2005) se comparado com o obtido neste estudo em ovo atomizado em escala laboratorial (0,0212 µg 7-cetocolesterol/ mg lipídio) (Tabela 9). Além disso, é importante considerar, que as características do alimento e as interações entre seus componentes e produtos de decomposição, durante o processamento e/ou estocagem, definem o perfil dos óxidos formados e as quantidades correspondentes (MORALES-AIZPURÚA; TENUTA-FILHO, 2002).

Tabela 12. Umidade (U), capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) e 7-cetocolesterol (7-CETO) do ovo integral pasteurizado atomizado sem antioxidantes (controle) e com a mistura de antioxidantes otimizada (AA), estocado por até 90 dias em embalagem impermeável ao oxigênio, sob atmosfera de nitrogênio, ao abrigo da luz e a 25±2ºC

Amostras	Dia	U	CATL	AS-233	7-CETO
Controle 25°C	1	$2,93^{c}$±0,17	$2,55^{abc}$ ±0,29	$3,86^{a}$±0,45	$0,0198^{d}$±0,0002
AA 25°C	1	$3,01^{bc}$±0,27	$1,82^{cd}$±0,33	$1,67^{bc}$±0,13	$0,0332^{a}$±0,0005
Controle 25°C	30	$2,89^{c}$±0,32	$2,74^{ab}$±0,20	$1,39^{bcd}$±0,23	$0,0236^{c}$±0,0004
AA 25°C	30	$3,33^{bc}$±0,19	$2,85^{ab}$±0,13	$0,77^{d}$±0,009	$0,0213^{d}$±0,0007
Controle 25°C	60	$2,91^{bc}$±0,23	$2,56^{ab}$±0,19	$0,92^{cd}$±0,25	$0,0305^{b}$±0,0067
AA 25°C	60	$2,79^{c}$±0,04	$1,65^{d}$±0,19	$1,59^{bc}$±0,01	$0,0216^{cd}$±0,0002
Controle 25°C	90	$3,95^{abc}$±0,15	$2,27^{bcd}$±0,33	$1,63^{bc}$±0,10	$0,0235^{cd}$±0,0033
AA 25°C	90	$3,48^{abc}$±0,04	$2,91^{a}$±0,42	$1,90^{b}$±0,37	$0,0195^{d}$±0,0010
p-valor*		0,50	0,51	0,05	0,30
p-valor#		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Resultados médios (n=3)±desvio-padrão expressos em base seca. U: g de umidade/100g; CATL: equivalente em mg de α-tocoferol/ g; AS-233: equivalente em µg 7-cetocolesterol/ mg lipídio; 7-CETO: µg 7-cetocolesterol/ mg lipídio. Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes (p< 0,05), de acordo com o teste de Tukey ou Kruscal-Wallis.*Valor-p para teste de homogeneidade de variâncias de Hartley (F-max); #Valor-p para a análise de variância univariada ou teste de Kruscal-Wallis

Sob as mesmas condições anteriores (Tabela 9), exceto em relação à temperatura, que foi maior, a 25°C (Tabela 12), houve diferenças entre os resultados. A CATL, mantida estável a 5°C (Tabela 11), a 25°C (Tabela 12) teve seu nível rebaixado no 60° dia e aumentado no 90° dia, sem razão aparente. Conforme a Tabela 12 houve diminuição das AS-233 após 1° dia e, do 7-CETO após 30º e 60°dias. Eventualmente, a redução observada das AS-233 e 7-CETO tenha sido resultante do efeito dos antioxidantes e da provável transformação em outros óxidos de colesterol não quantificados nas condições analíticas estabelecidas (MAERKER,1987; KITAHARA, 2004; HUR; PARK; JOO, 2007).

Estudo realizado por Kitahara (2004) revelou que o ovo atomizado e liofilizado sob estocagem por 180 dias, a 28◦C, resultou no progresso da oxidação do colesterol (22,80 a 109,1 µg óxidos/g).

Constam da Tabela 13**,** resultados dos efeitos das temperaturas de estocagem (5 e 25°C) sobre a umidade (U), capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) e 7-cetocolesterol (7-CETO), relativos ao ovo integral pasteurizado atomizado sem antioxidantes (controle).

Foi verificado aumento da umidade (134,81 a 139%) dos 90 dias de estocagem, independentemente da temperatura, mas sem reflexo aparente sobre os demais indicadores analisados na Tabela 13. O aumento da umidade poderia significar maior atividade de água (ANGELO, 1992) e esta afetar as reações envolvendo a CATL, AS-233 e 7-CETO.

No caso presente, o incremento da umidade poderia ter sido consequência da manipulação inapropriada das amostras e/ou fechamento inadequado da embalagem, e/ou ainda, uma questão analítica, as quais não puderam ser avaliadas.

A CATL e o 7-CETO foram mantidos estáveis no período experimental, enquanto as AS-233 reduzidas, diferindo com a temperatura após 30 dias de estocagem, sendo menor a 25°C.

Tabela 13. Umidade (U), capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) e 7-cetocolesterol (7-CETO) do ovo integral pasteurizado atomizado sem antioxidantes (controle) estocado por 90 dias em embalagem impermeável ao oxigênio, sob atmosfera de nitrogênio, ao abrigo da luz, a 5±2ºC e a 25±2ºC

Amostras	Dia	U	CATL	AS-233	7-CETO
Controle 5°C	1	$2,93^{b}$±0,17	$2,29^{ab}$±0,10	$3,57^{a}$±0,37	$0,0212^{ab}$±0,0002
Controle 25°C	1	$2,93^{b}$±0,17	$2,55^{ab}$ ±0,29	$3,86^{a}$±0,45	$0,0198^{ab}$±0,0002
Controle 5°C	30	$2,89^{b}$±0,27	$2,38^{ab}$±0,49	$3,38^{a}$±0,57	$0,0259^{ab}$±0,0085
Controle 25°C	30	$2,89^{b}$±0,32	$2,74^{a}$±0,20	$1,39^{b}$±0,23	$0,0236^{ab}$±0,0004
Controle 5°C	60	$3,19^{b}$±0,27	$2,40^{ab}$±0,05	$1,31^{b}$±0,14	$0,0198^{ab}$±0,0004
Controle 25°C	60	$2,91^{b}$±0,23	$2,56^{ab}$±0,19	$0,92^{b}$±0,25	$0,0305^{a}$±0,0067
Controle 5°C	90	$4,08^{a}$±0,16	$1,88^{b}$ ±0,08	$1,36^{b}$±0,17	$0,0163^{bc}$±0,0003
Controle 25°C	90	$3,95^{a}$±0,15	$2,27^{ab}$±0,33	$1,63^{b}$±0,10	$0,0235^{ab}$±0,0033
p-valor*		0,98	0,09	0,34	<0,001
p-valor#		<0,001	0,03	<0,001	0,03

Resultados médios (n=3)±desvio-padrão expressos em base seca. U: g de umidade/100g; CATL: equivalente em mg de α-tocoferol/ g; AS-233: equivalente em µg 7-cetocolesterol/ mg lipídio; 7-CETO: µg 7-cetocolesterol/ mg lipídio. Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes (p< 0,05), de acordo com o teste de Tukey ou Kruscal-Wallis.*Valor-p para teste de homogeneidade de variâncias de Hartley (F-max); #Valor-p para a análise de variância univariada ou teste de Kruscal-Wallis

Caboni et al. (2005) ao avaliarem o efeito da atomização e estocagem (4°C e 20°C/ 12 meses) sobre a qualidade química do ovo integral, verificaram que a atomização industrial não afetou a composição dos tocoferóis (α-tocoferol e γ-tocoferol), mas provocou a reação de Maillard e aceleração da oxidação do colesterol, aumentando de 24 para 55 µg a ocorrência de óxidos/g de lipídio. Não houve mudanças significativas nos compostos analisados (tocoferol, retinol, óxidos de colesterol e glicose) quando o ovo atomizado foi estocado a 4°C. Entretanto, a 20°C, ocorreu aumento significativo de óxidos de colesterol, de 63,8 para 167 µg/ g de lipídio, enquanto os tocoferóis permaneceram praticamente inalterados e os retinóis diminuíram de 0,44 para 0,21 mg/ 100g de ovo.

Mazalli e Bragagnolo (2009), visando verificar o efeito do processamento (cozimento e fritura) do ovo estocado a 5°C e 25°C, por 45 dias, relataram que

apenas o 7-cetocolesterol foi afetado pela temperatura de estocagem, e a sua concentração foi maior em ovos mantidos a 25°C.

Na Tabela 14 estão os resultados dos efeitos das temperaturas de estocagem (5 e 25°C) sobre a umidade, a capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) e o 7-cetocolesterol (7-CETO) do ovo integral pasteurizado atomizado adicionado de antioxidantes, mantido por até 90 dias.

A umidade, a CATL e as AS-233, não foram afetadas em relação às temperaturas ensaiadas, no período experimental. Entretanto, após 60 e 90 dias a concentração de 7-cetocolesterol foi afetada, sendo menor a 5°C.

Tabela 14. Umidade (U), capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL), substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) e 7-cetocolesterol (7-CETO) do ovo integral pasteurizado atomizado com a mistura de antioxidantes otimizada (AA), estocado por até 90 dias em embalagem impermeável ao oxigênio, sob atmosfera de nitrogênio, ao abrigo da luz, a 5±2ºC e a 25±2ºC

Amostras	Dia	U	CATL	AS-233	7-CETO
AA 5°C	1	$3{,}01^{bc}$±0,27	$1{,}92^{b}$±0,27	$1{,}77^{ab}$±0,21	$0{,}033^{a}$±0,0006
AA 25°C	1	$3{,}01^{bc}$±0,27	$1{,}82^{b}$±0,33	$1{,}67^{ab}$±0,13	$0{,}0332^{a}$±0,0005
AA 5°C	30	$2{,}18^{bc}$±0,10	$2{,}31^{ab}$±0,17	$1{,}23^{bc}$±0,14	$0{,}0200^{bcd}$±0,0005
AA 25°C	30	$3{,}33^{ab}$±0,19	$2{,}85^{a}$±0,13	$0{,}77^{c}$±0,009	$0{,}0213^{bc}$±0,0007
AA 5°C	60	$2{,}08^{bc}$±0,48	$2{,}15^{b}$±0,17	$1{,}43^{ab}$±0,13	$0{,}0190^{d}$±0,0010
AA 25°C	60	$2{,}79^{bc}$±0,04	$1{,}65^{b}$±0,19	$1{,}59^{ab}$±0,01	$0{,}0216^{b}$±0,0002
AA 5°C	90	$2{,}93^{bc}$±0,11	$2{,}91^{a}$±0,13	$1{,}41^{ab}$±0,25	$0{,}0158^{e}$±0,0009
AA 25°C	90	$3{,}48^{ab}$±0,04	$2{,}91^{a}$±0,42	$1{,}90^{a}$±0,37	$0{,}0195^{cd}$±0,0010
p-valor*		0,36	0,7	0,11	0,73
p-valor#		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Resultados médios (n=3)±desvio-padrão expressos em base seca. U: g de umidade/100g; CATL: equivalente em mg de α-tocoferol/g; AS-233: equivalente em µg 7-cetocolesterol/mg lipídio; 7-CETO: µg 7-cetocolesterol/mg lipídio. Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes (p< 0,05), de acordo com o teste de Tukey ou Kruscal-Wallis.*Valor-p para teste de homogeneidade de variâncias de Hartley (F-max); #Valor-p para a análise de variância univariada ou teste de Kruscal-Wallis

Huber, Pike e Huber (1995) relataram que, após a oxidação induzida com sulfato de cobre e estocagem acelerada (60ºC) da gema de ovo atomizada, a adição de antioxidantes (BHA, palmitato de ascorbila e mistura de tocoferóis) não foi suficiente para erradicar completamente a oxidação do colesterol. No entanto, os antioxidantes reduziram os níveis de 7-cetocolesterol, 7α-hidroxicolesterol e 7β-hidroxicolesterol, mas sem afetar os epóxidos e triol.

Lai et al. (1995) não verificaram redução de óxidos de colesterol em ovo integral atomizado, na presença *terc*-butil hidroquinona (TBHQ) e óleoresina de alecrim, cuja ineficiência foi atribuída à uma provável volatilização e subsequente perda durante a atomização. Enquanto, Guardiola et al. (1997) adicionando ao ovo líquido integral uma mistura de palmitato de ascorbila com α-tocoferol e galato de propila antes da atomização, concluíram que a combinação do palmitato de ascorbila com o α-tocoferol resultou num ligeiro efeito pró-oxidante, ao passo que o

galato de propila preveniu a perda de ácidos graxos poli-insaturados, a formação de óxidos de colesterol e a redução da cor, associada à oxidação de carotenóides.

A adição de extrato de tocoferóis ao ovo atomizado não evitou o aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e dos ácidos graxos livres, ou a redução dos carotenóides totais, ao longo de 90 dias de estocagem, à temperatura ambiente. Contudo, os tocoferóis reduziram a formação de óxidos de colesterol, demonstrando melhoria significativa do produto final (MEDINA, 2009). Ao acrescentar extratos comerciais de alecrim e de tocoferóis, ao ovo integral pasteurizado antes da atomização, também obtido em laboratório, Escarabajal (2011) concluiu que ambos não foram efetivos na prevenção da oxidação do colesterol.

Os níveis de 7-cetocolesterol (0,033 µg/ mg lipídio) encontrados por Escarabajal (2011) em ovo atomizado em escala laboratorial, estão próximos ao demonstrado neste estudo (Tabelas 11-14).

Ao verificar o efeito da adição da mistura de antioxidantes e das condições de estocagem do ovo integral pasteurizado atomizado sobre a estabilidade oxidativa do colesterol, não foi visualizada correlação ($p>0,05$) entre as substâncias absorvidas a 233 nm e o 7-cetocolesterol.

Foram correlacionados entre si a CATL e o tempo de estocagem de 90 dias, a 5±2°C, do ovo integral pasteurizado atomizado adicionado de antioxidantes, conforme a Figura 16, onde constam, a equação da reta, r, R^2 e o valor de significância da regressão (p). Foi encontrada correlação linear crescente da CATL durante os 90 dias experimentais, sem que houvesse fundamentação teórica a justificar o resultado. Não havendo diferença estatística (ANOVA) entre os valores referentes ao 1°, 30° e 60° dias, o valor atribuído ao 90° dia foi considerado inconsistente (Tabela 14). Assim, correlação encontrada na Figura 18 não foi confirmada.

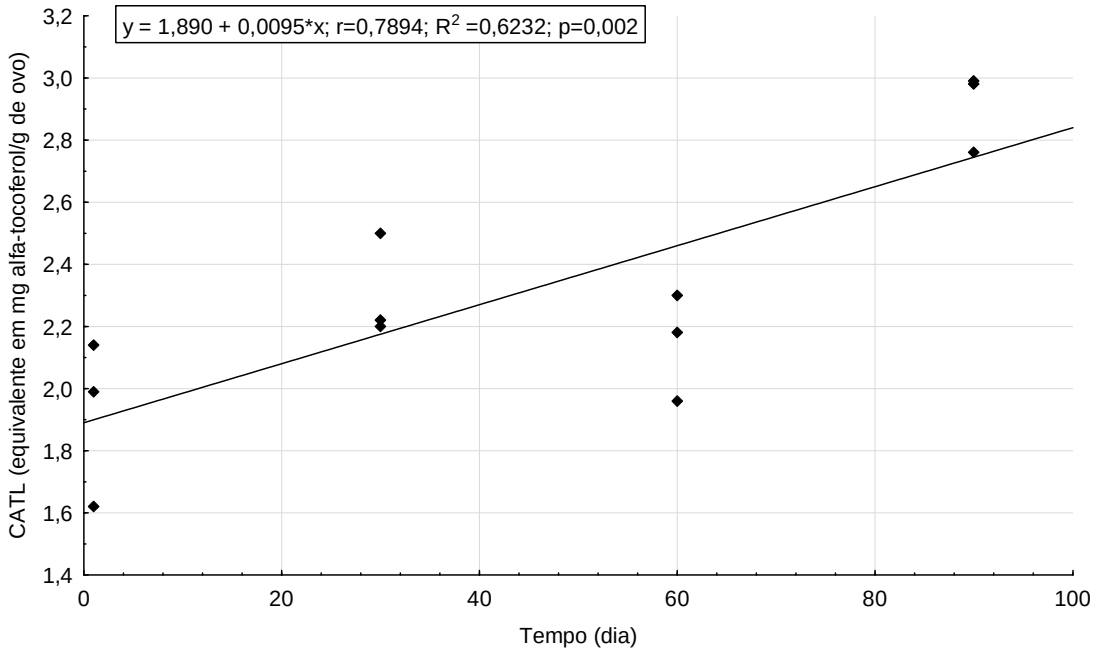


Figura 16. Correlação entre a capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) (equivalente em mg de α-tocoferol/ g) e o tempo de estocagem, a 5±2°C, do ovo integral pasteurizado atomizado adicionado de antioxidantes

A capacidade antioxidante do ovo integral pasteurizado atomizado, preparado também em escala laboratorial, medida pelo radical DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazila), por Escarabajal (2011), permaneceu estável ao longo de 90 dias de estocagem, a 25°C, o que, de certa forma, tem coerência com os resultados da Figura 18.

A Figura 17 mostra a correlação entre o 7-cetocolesterol e o tempo de estocagem, a 5±2°C, do ovo integral pasteurizado atomizado adicionado de antioxidantes, e a indicação da equação da reta, r, R^2 e o valor de significância da regressão (p). Foi observada correlação linear decrescente do 7-cetocolesterol durante os 90 dias de experimento. Ainda que estável quimicamente, pode ter havido uma possível transformação do 7-cetocolesterol em outros compostos (MAERKER, 1987; KITAHARA, 2004; HUR; PARK; JOO, 2007) e/ou o fato de os antioxidantes usados terem sido eficientes em reduzir a suas concentrações (HUBER; PIKE; HUBER, 1995), poderiam justificar os resultados encontrados.

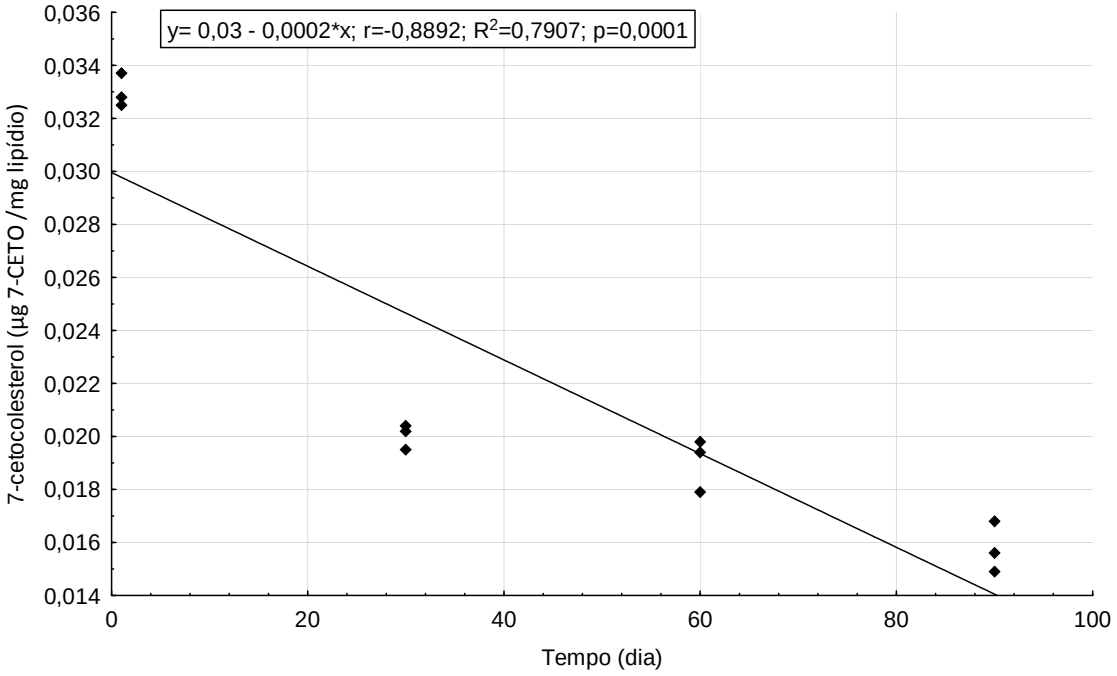


Figura 17. Correlação entre o 7-cetocolesterol (µg 7-CETO/ mg lipídio) e o tempo de estocagem (90 dias), a 5±2°C, do ovo integral pasteurizado atomizado adicionado de antioxidantes

A Figura 18 corresponde à correlação entre o 7-cetocolesterol (7-CETO) e o tempo de estocagem, a 25±2°C, do ovo integral pasteurizado atomizado adicionado de antioxidantes, com a indicação da equação da reta, r, R^2 e o valor de significância da regressão (p). Foi constatada correlação linear decrescente da concentração do 7-cetocolesterol ao longo dos 90 dias de experimento, a semelhança do que foi obtido a 5±2°C (Figura 17) e discutido a respeito.

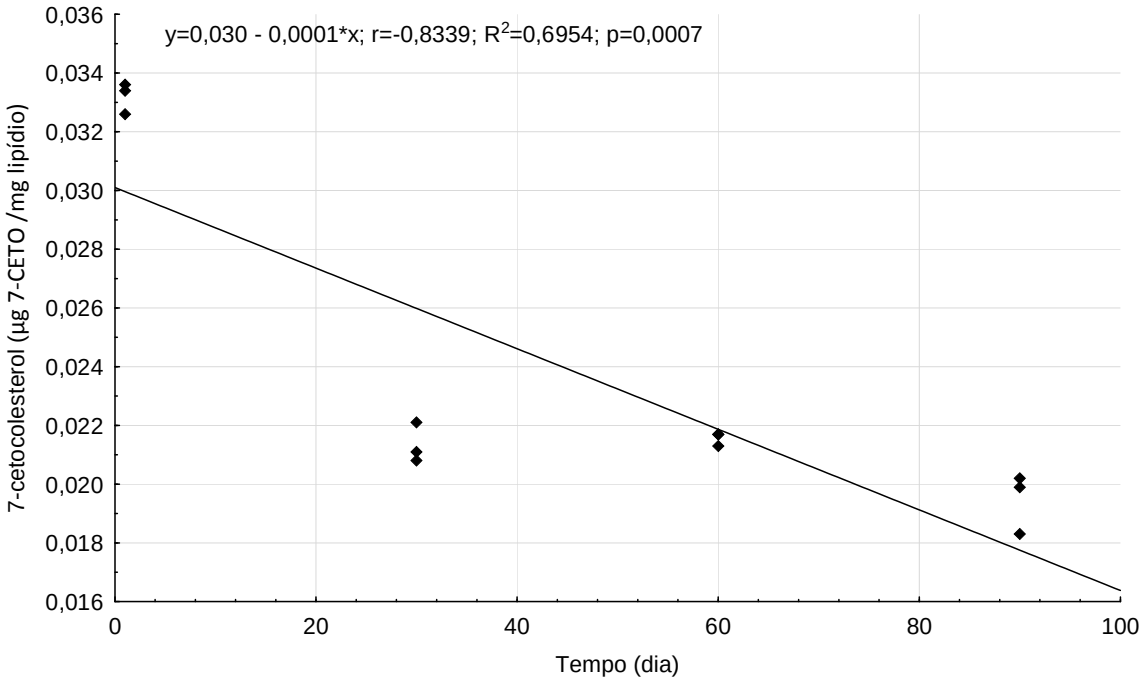


Figura 18. Correlação entre o 7-cetocolesterol (µg 7-CETO/ mg lipídio) e o tempo de estocagem (90 dias), a 25±2°C, do ovo integral pasteurizado atomizado adicionado de antioxidantes

Os resultados encontrados diferiram dos relatados por Escarabajal (2011), em ovo integral pasteurizado atomizado, também obtido em escala de laboratório, sem adição de antioxidantes e estocado a 25°C. O 7-cetocolesterol encontrado (µg/ mg de lipídio) aumentou de 0,033 (dia 0) a 0,044 (após 90 dias), podendo estar associado à ausência de antioxidantes e às diferentes condições de estocagem adotadas.

A correlação, estabelecida na Figura 19, apontando a equação da reta, r, R^2 e o valor de significância da regressão (p), entre as substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) e o tempo de estocagem, a 25±2°C, do ovo integral pasteurizado atomizado sem adição de antioxidantes, foi linear decrescente ao longo dos 90 dias de experimento.

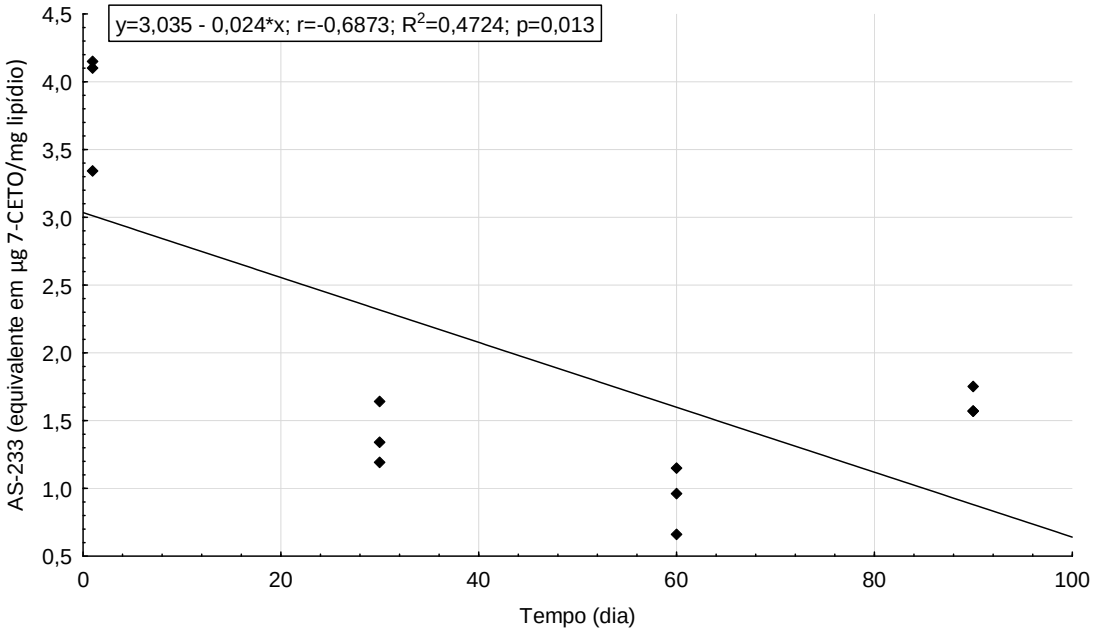


Figura 19. Correlação entre as substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) (equivalente em µg 7-CETO/ mg lipídio) e o tempo de estocagem (90 dias), a 25±2°C, do ovo integral pasteurizado atomizado sem adição de antioxidantes

A adição de BHA e tocoferóis à gema líquida, seguida da atomização e estocagem, sob temperatura ambiente, por 36 meses, resultou na inibição da formação de 7-cetocolesterol. Paralelamente, uma maior formação de 7α-hidroxicolesterol (7α-OH) e 7β-hidroxicolesterol (7β-OH) foi verificada (BRINKERHOFF et al., 2002). Como apontado anteriormente, o 7α-OH e o 7β-OH foram incluídos nesta parte do presente trabalho. Não foram quantificados pela ocorrência abaixo dos limites de quantificação correspondentes.

As condições de estocagem adotadas e a adição dos antioxidantes foram efetivas para manter mais estável o estado oxidativo do ovo integral pasteurizado atomizado, sendo mais efetivo quando estocado a 5°C. Assim, é demonstrado que

as condições de estocagem e a mistura de antioxidantes otimizada poderiam ser adotadas em escala industrial.

Nesse contexto, seriam recomendáveis que fossem testadas outras misturas de antioxidantes e outros tipos de embalagens. Recomenda-se a submissão dos produtos de ovos adicionados de antioxidantes a análise sensorial e análise das suas propriedades reológicas para verificar se a presença dos antioxidantes em suas diversas concentrações e combinações interferem nesses atributos.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O método do fosfomolibdênio usado para quantificar a capacidade antioxidante total da fração lipídica (CATL) em ovo integral (*in natura*, pasteurizado ou atomizado) apresentou adequação suficiente quanto à linearidade da curva de calibração, o limite de detecção, o limite de quantificação, a recuperação e a precisão.

A pasteurização do ovo líquido integral não afetou a CATL, tão pouco a estabilidade oxidativa de ácidos graxos e do colesterol do produto. A atomização do ovo líquido integral pasteurizado, ao contrário, diminuiu a CATL e provocou a oxidação de ácidos graxos e colesterol.

A estocagem do ovo integral pasteurizado atomizado, por 90 dias, mantido em embalagem impermeável ao oxigênio, sob atmosfera de nitrogênio, ao abrigo da luz e a 5±2°C, foi efetiva para manter estável a hidratação e a CATL, além de prevenir a oxidação de ácidos graxos.

O efeito protetor da mistura dos antioxidantes, alecrim, chá verde e BHA, ao ovo integral pasteurizado atomizado exerceu influência variada sobre a estabilidade oxidativa lipídica do produto. Dessa forma, em relação ao controle, os ensaios 1, 2 e 7 aumentaram a disponibilidade da CATL, enquanto no ensaio 9 houve redução. Já as TBARS aumentaram nos ensaios 5 e 7, caracterizando a oxidação de ácidos graxos. Enquanto que a capacidade redutora pelo reativo de Folin – Ciocalteau foi maior no ensaio 7, podendo ter havido correlação com uma maior concentração de antioxidantes naturais (alecrim e chá verde). Além disso, a quantidade dos ácidos graxos livres verificados nos ensaios 3, 5 e 8 aumentaram, e as substâncias absorvidas a 233 nm nos ensaios 4 e 8 reduziram, pressuposta pela ação dos antioxidantes envolvidos.

Foi encontrado um modelo matemático adequado e conveniente, por intermédio da metodologia de superfície de resposta, para descrever a formação das substâncias absorvidas a 233 nm durante a atomização do ovo líquido integral pasteurizado, podendo ser usado para fins preditivos.

A otimização, visando à inibição e/ou diminuição na formação das substâncias absorvidas a 233 nm durante a atomização do ovo líquido integral pasteurizado, resultou num sistema antioxidante proposto pela RSM composto de 150 ppm de BHA, 600 ppm de alecrim e 300 ppm de chá verde.

A presença ou não dos antioxidantes no ovo integral pasteurizado atomizado, mantido por 90 dias, a 5°C, afetou somente a formação das substâncias absorvidas a 233 nm. Enquanto que a 25°C, somente a umidade não foi afetada. A estabilidade oxidativa foi melhor quando o produto foi estocado a 5°C do que a 25°C.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ADCOCKS, C.; COLLIN, P.; BUTLLE, D.J. Catechinsfrom green tea (Camellia sinensis) inhibit bovine and human cartilage proteoglycan and type II collagen degradation in vitro. **Journal Nutrition**, Philadelphia, v.132, p.341-346, março, 2002.

ADDIS, P.B.; PARK, S.W. "**Cholesterol oxide contento of foods**" in "Biological effects of cholesterol oxides". S.K. Peng y R.J. Morin (Ed) CRC Press, Boca Raton-Ann Arbor-Londres, p. 71-88, 1992.

ADDIS, P.B.; PARK, P.W.; GUARDIOLA, F.; CODONY, R. **Analysis and health effects of cholesterol oxides**. In: McDONALD, R.E.; MIN, D.B.J. ed: Food lipids and health. New York, 1996. 473p.

AFONSO, M. S.; SANTANA, L. S.; MANCINI-FILHO, J. Interação entre antioxidantes naturais e espécies reativas do oxigênio nas doenças cardiovasculares: perspectivas para a contribuição do alecrim (*Rosmarinus offi cinalis* L.). **Nutrire*:* rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. J. Brazilian Soc. Food Nutr**., São Paulo, SP, v. 35, n. 1, p. 129-148, abr. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VGILÂNCIA SANITÁRIA. **Métodos Físico-Químicos para Análises de Alimentos.** 4.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 1020p. (Série A. Normas e manuais técnicos).

AHN, J.; GRU, N, I.; MUSTAPHA, A. Effects of plant extracts on microbial growth, color change and lipid oxidation in cooked beef. **Food Microbiology**, v. 24, p.7–14. 2007.

AI-LI, J.; CHANG-HAI, W. Antioxidant properties of natural components from Salvia plebeia on oxidative stability of ascidian oil. **Process Biochemistry**, n. 41, p.1111–1116, 2006.

AJUYAH, A. O.; HARDIN, R.T.; SIM, J.S.. Effect of dietary full-fat flax seed with and without antioxidant on the fatty acid composition of major lipid classes of chicken meats. **Poultry Sci**. v. 72, p.125–136, 1993.

ALLEN, J.C., HAMILTON, R.J. **Rancidity in foods***.* London: Applied Science, 1983. 199p.

ALAIZ, M.; ZAMORA, R.; HIDALGO, F. J. Contribution of the formation of oxidized lipid/aminoacid reaction products to the protective role of amino acids in oil and fats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 44, p. 1890–1895, 1996.

ALONSO, A. M.; DOMINGUEZ, C.; GUILLEN, D. A.; BARROSO, C. G. Determination of antioxidant Power of red and White wines by a new eletrochemical method and its correlation wiht polyphenolic content. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, p. 3112-3115, 2002.

ALGHAZEER, R.; SAEED, S.; HOWELL, N. K. Aldehyde formation in frozen mackerel (Scomber scombrus) in the presence and absence of instant green tea. **Food Chemistry**. v. 108, p. 801−810, 2008.

ANGELO, A. J. Lipid oxidation in food. **American chemical society.** Washington, DC, p. 1-13, 1992.

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

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Avaliação do óleo de girassol adicionado de antioxidantes sob estocagem. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**. v. 28, n. 2, Campinas, 2008.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COÏSSON, J. D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus offi cinalis* L. **J. Agric. Food Chem**. v. 52, n. 11, p. 3530-3535, 2004.

ANTONIO, G. C.; KUROZAWA, L. E.; XIDIEH MURR, F. E.; PARK, K. J. Otimização da desidratação osmótica de batata doce (Ipomoea batatas) utilizando metodologia de superfície de resposta. **Braz. J. Food Technol**., v.9, n.2, p. 135-141, abr./jun. 2006.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos**: teoria e prática. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004. 478p.

ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potencial antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**. n. 9, v. 20, p. 523-524, 2003.

BAILEY, A. E. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 5ª ed. John Wiley: New York, v.3, 1996.

BARBUT, S.; JOSEPHSON, D. B.; MAURER, A. J. Antioxidant properties of rosemary oleoresin in turkey sausage. **Journal of Food Science**, Malden, v. 50, n. 5, p. 1356-1359, 1985.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M.F.; ARAÚJO, M.C.U. Recomendações paracalibração em química analítica – Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, p. 856-865, 2002.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Food chemistry**, Springer Verlag, Berlin (1999).

BERGQUIST, D.H. Egg dehydration. In: STADELMAN, W.J.; COTTERIL, O.J. (Ed), **Egg science and technology** (4th ed.), Food Product Press, Binghamton, NY, p. 335–376, 1995.

BERTECHINI, A.G. Mitos e verdades sobre ovos de consumo. In: CONFERÊNCIA APINCO, 2003 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVICOLAS, 2003, Campinas. **Anais** Apinco: FACTA, 2003, v. 1, p. 19-26.

BERTOLIN, T. E.; CENTENAR, A.; GIACOMELLI, B.; GIACOMELLI, F.; COLLA, L. M.; RODRIGUES, V. M. Antioxidantes naturais na prevenção da oxidação lipídica em charque de carne ovina. **Braz. J. Food Technol**., Campinas, v. 13, n. 2, p. 83-90, abr./jun. 2010.

BERTOLIN, T. E.; MARGARITES, A. C. F.; GIACOMELLI, B.; FRUETTI, A.; HORST, C.;TEIXEIRA, D. M. F. Ficocianina, tocoferol e ácido ascórbico na prevenção da oxidação lipídica em charque. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 14, n. 4, p. 301-307, out./dez. 2011.

BHALE, S. D.; XU, Z.; PRINYAWIWATKUL, W.; KING, J. M.; GDBER, J. S. Oregano and Rosemary Extracts Inhibit Oxidation of Long-Chain n-3 Fatty Acids in Menhaden Oil. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, 2007.

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUES-AMAYA, D.B. Comparison of the cholesterol of Brazilian chiken and quail eggs. **J. Food Compos. Anal.**, Roma, v.16, p.147-153, 2003.

BRANDÃO, P. A.; COSTA, F.G.P.; BARROS, L.R., NASCIMENTO, G.A.J. Ácidos graxos e colesterol na alimentação humana**. Agropecuária técnica**, v. 26, n.1, p.5-14, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto n° 30691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. **Dário Oficial da União**, Brasília, 7 julho de 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (**MAPA**). Portaria n° 01, de 21 de fevereiro de 1990. “Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados”. Disposnível em: http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/ Acesso em: 20/03/2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (**ANVISA**). Resolução n° 899 de 29 de maio de 2003. “Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos”. Disposnível em: httm://e-legis.anvisa.gov.br/ Acesso em: 16/03/2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (**ANVISA**). Resolução RDC nº 23, de 15 de fevereiro de 2005. Aprova “Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos óleos e gorduras - subcategoria creme vegetal e margarinas”. Disponível em: www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/aditivos.htm. Acesso em: 23/05/2011.

BRINKERHOFF, B. E.; HUBBER, K. C.; HUBBER, C. S.; PIKE, O. A. Effect of antioxidants on cholesterol oxidation in spray-dried egg yolk during extended ambient storage. **Food Chem. Toxicol**. Oxford, v. 67, n.8, p.2857-2857, 2002.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003.

BÖSINGER, S.; LUF, W.; BRANDL, E. "Oxysterols": Their Occurrence and Biological Effects, **Int. Dairy J**. n. 3, p.1–33, 1993.

BOTSOGLOU, N.; FLOROU-PANERI, P.; BOTSOGLOU, E.; DOTAS, V. GIANNENAS, I.; KOIDIS, A.; MITRAKOS, P. The effect of feeding rosemary, oregano, saffron and *α*-tocopheryl acetate on hen performance and oxidative stability of eggs. **South African Journal of Animal Science**. v. 35, n. 3, 2005.

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

BOZIN B.A; NEDA, M. D. B.; ISIDORA, S. C.; ANACKOV, G. D.; RUZICA, I.Phenolics as antioxidants in garlic (Allium sativum L., Alliaceae). **Food Chemistry**. n.111, p. 925–929, 2008.

BUCK, D. F. Antioxidants in soy oil. **Journal of the American Oil Chemical Society**, v. 58, p. 275-278, 1981.

BUCHI – **Operation manual mini spray dryer B-290**. [s.n.t] [manual de equipamento]. 2009.

BUNKOVA, R; MAROVA, I; NEMEC, M. Antimutagenic properties of green tea. **Plant Foods Hum Nutr.** v. 60, p. 25-29, 2005.

BURLEY, R. W.; VADEHRA, D. V. **Egg yolk**: Structure and properties. In: The Avian Egg. WILEY, J. (Ed.), Chemistry and Biology. New York, NY, p. 171–234, 1989.

BURTON, G.W. Antioxidant action of carotenoids. **J. Nutr**. v. 119, n. 1, p. 109-111, 1989.

BUSCH T.J.; KING, A.J. Artifact generation and monitoring in analysis of cholesterol oxide products. **Anal Biochem**. v. 399, p. 1–14, 2009.

CABONI, M.F.; COSTA, A.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T.; LERCKER, G. High Performance Liquid Chromatographic Separation of Cholesterol Oxidation Products, **Chromatographia.** n. 46, p. 151–155, 1997.

CABONI, M.F.; BOSELLI, E.; MESSIA, M.C.; VELAZCO, V.; FRATIANNI, A.; PANFILI, G.; MARCONI, E. Effect of processing and storage on the chemical quality markers of spray-dried whole egg. **J. Food Chem.**, Barking, v. 92, p. 293-303, 2005.

CAI, Y. J.; MA, L. P.; HOU, L. F.; ZHOU, B.; YANG, L.; LIU, Z. L. Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes. **Chemistry and Physics of Lipids**. Limerick, v. 120, p.109-117, 2002.

CAMPOS, G. C. M.; TOLEDO, M. C. F. Determinação de BHA, BHT e TBHQ em Óleos e Gorduras por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Braz. J. Food Technol**., v. 3, p. 65-71, 2000.

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, n. 11, p. 1090-1099, 2009.

CAVALCANTI, A. S. S.; ROSA, J. A. B.; LIMA, M. S. C. S.; SILVA, A. G. O uso do chá verde, Camellia sinensis L. (Theaceae) em produtos tópicos – uma revisão. **Natureza on line**, v. 5, n. 2, p. 76-84, 2007.

CHAN, S.H; GRAY, J.I; GOMAA, E.A. Cholesterol oxidation in whole Milk powders as influenced by processing and packaging. **Food Chem**., v. 47, n. 4, p.321-328, 1993.

CHEN, Q.; SHI, H.; HO, C. Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 69, n. 10, p. 999-1002, 1992.

CHEN, B. H.; CHEN, Y. C. Evaluation of the analysis of cholesterol oxides by liquid chromatography. **J. chromatography A**. Amsterdan, v. 661, p. 127 – 136, 1994.

CHERIAN, G.; WOLFE, F.H.; SIM, J.S. Feeding dietary oils with tocopherols: effects on internal qualities of eggs during storage. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 15-18, 1996.

CHERIAN, G.; HOLSONBAKE, T.B.; GOEGER, M.P. Fatty acid composition and egg componets of specialty eggs. **Poultry Sci**., v. 81, p. 30-33, 2002.

CHOW, C. K. **Biological effects of oxidized fatty acids**. In: Fatty acids in Foods and Their Health Implications. C. K. Chow (Ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, NY, p.689–705, 1992.

CHU. Y.; HSU, H. Effects of antioxidants on peanut oil stability. **Food Chemistry**, v. 66, n. 1, p. 29-34, 1999.

CORONADO, S. A.; TROUT, G.; DUNSHEA, F. R.; SHAN, N. P. Antioxidant effects of rosemary extract and whey powder on the oxidative stability of wiener sausages during 10 months frozen storage. **Meat Sci**., v. 62, n. 2, p. 217-224. 2002.

CRASTES DE PAULET, A.; ASTRUC, M. E.; BASCOUL, J.; DEFAY, R. Biological effects of oxysterols. In: CRASTES DE PAULET, A.; DOUSTE-BLAZY, L.; PAOLETTI, R., (Ed). **Free radicals, lipoproteins membrane lipids.** New York: Plenum Press, 1990. p. 291-300. (NATO ASI series. Series A, Life science, v. 189). (Proceedings of a NATO Advanced Pesearch Workshop on Action of Free Radicals and Active Forms of Oxigeno n Lipoproteins and Membrane Lipids: cellular interactions and atherogenesis, 1998, Brandol, France).

CSALLANY, A.S.; KINDOM, S.E.; ADDIS, P.B.; LEE, J. HPLC method for quantitation of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues**. Lipids**, Champaign, v. 24, n. 7, p. 645-651, 1989.

CUNNINGHAM, F.E. **Egg-product pasteurization**. In: STADELMAN, W.J. and COTTERIL, O.J. (Ed). Egg Science and Technology, 4 ed., Binghamton: Food Products Press, 1994, p. 289-315.

CUVELIER, M. E.; BERSET, C.; RICHARD, H. Antioxidant constituents in sage (Salvia officinalis). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 3, p. 665-669, 1994.

DAI, F.; CHEN, W. F.; ZHOU, B. Antioxidant synergism of green tea polyphenols with a-tocopherol and L-ascorbic acid in SDS micelles. **Biochimie**. v. 90, p.1499-1505, 2008.

DANISCO. **GUARDIAN**® Natural Extracts. Disponível em: http://www.danisco.com/products/product_range/antioxidants/guardianr/ Acesso em: 15/02/2011.

DEANS, S.G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils, **International Journal of Food Microbiology.** v. 5, p. 165–180, 1987.

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

DEL BANO, M. J.; LORENTE, J.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; DEL RÍO, J. A.; ORTUÑO, A.; QUIRIN, K. W.; GERARD, D. Phenolic diterpenes, fl avones and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, fl owers, stems, and roots of Rosmarinus offi cinalis: antioxidant activity. **J. Agric. Food Chem**. v. 51, n. 15, p. 4247-4253, 2003.

DEREWIAKA, D.; OBIEDZIN´SKI, M. Cholesterol oxides content in selected animal products determined by GC-MS. **Eur. J. Lipid Sci. Technol**. n. 112, p.1130–1137, 2010.

DEMERTZIS, P.; KONTOMINOS, M. G. Study of water sorption of egg powders by inverse gás chromatography. **Zeitschrift fuer lebensmittel – unter suchung and forschung**, v. 186, n. 3, p. 213-217; 1988.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimisation of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, p. 214–219, 1980.

DONATO, D. C. Z.; GANDRA, E. R. S.; GARCIA, P. D.; REIS, C. B.; GAMEIRO, A. H. A questão da qualidade no sistema agroindustrial do ovo. In: 47º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Porto Alegre-RS. **Anais** do SOBER, p.1-13, 2009.

DUTTA, P. C.; CABONI, M. F.; DICZFALUSY, U.; DIONISI, F.; DZELETOVIC, S.; GRANDGIRARD, A.; GUARDIOLA, F.; KUMPULAINEN, J.; LEBOVICS, V. K.;

PIHALAVA, J-M.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; ULBERTH, F. **In natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease**, KUMPULAINEN, J.; SALONEN, J. T. (Ed), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, p. 309-315, 1999.

DUTTA, P. C.; SAVAGE, G.P. **In cholesterol and phytosterol oxidation products in foods and biological smples:** Analysis, Occurrence and Biological Effects. GUARDIOLA, F.; DUTTA, P.; SAVAGE, G.P.; CODONY, R. (Eds), AOCS Press, Champaign, IL, p. 114-123, 2002.

DUTTA, P. **Accurate and reproducible methods for analysis of sterol oxidation products in foods:** An overview. Journal of AOAC International. v. 87, n. 2, p. 439-440, 2004.

ESCARABAJAL, C.; TENUTA-FILHO, A. Estabilidade oxidativa do colesterol em ovo integral em pó. **Rev. Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v. 41, p. 483-490, 2005.

ESCARABAJAL, C. **Estabilidade oxidativa de colesterol em ovo líquido, ovo líquido pasteurizado e em ovo em pó atomizado, obtidos em laboratório**. 2011. 106p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ESKIN, N.A. **Biochemistry of food processing**: Browning reactions in foods. In Biochemistry of foods. San Diego, CA: Academic Press. p. 239–295, 1990.

ESTEVEZ, M.; RAMIREZ, R.; VENTANAS, S.; CAVA, R.; Sage and rosemary essential oil versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver patê. LWT. **Food Sci. Technol**., v. 40, n.1, p. 58-65, 2007.

EXARCHOU, V.; NENADIS, N.; TSIMIDOU, M.; GEROTHANASSIS, I. P.; TROGANIS, A.; BOSKOU, D. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from greek oregano, greek sage and summer savory. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 19, p. 5294-5299, 2002.

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS/USP – **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.** Disponível em: <www.fcf.usp.br/Tabela/>. Acessado em: 14/07/2011.

FACCO, E. M. P.; LAGE, M. E.; GODOY, H. T. Influence of vitamin E supplemented diet on charque quality and lipid stabilization. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** Curitiba, v. 52, n. 3, p. 729-736, 2009.

FARMAOVOS INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE OVOS. **Processo** – ovo integral pasteurizado. Disponível em: http://www.famaovos.com.br/. Acessado em: 19/07/2011.

FASSEAS, M., MOUNTZOURIS, K., TARANTILIS, P., POLISSOU, M.; ZERVAS, G. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. **Food Chemistry**, v.106, p.1188–1194, 2007.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos**: princípios e prática, 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602p.

FENNEMA, O. R. **Quimica de los alimentos**. 2ed. Zaragoza: Acribia, 1993.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. **Fennema's food chemistry**, 4ed. Boca Raton: CRC Press, 2007, 1100p.

FERGUSON, L. R., HARRIS, P. J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **European Journal of Cancer Prevention**, Oxford, v. 8, n.1, p.17-25, 1999.

FINOCCHIARO, E. T.; RICHARDSON, T. Sterol oxides in foodstuffs: a review. **J. Food Prot.**, Ames, v. 46, n. 10, p. 917-925, 1983.

FLOROU-PANERI, P.; DOTAS, D.; MITSOPOULOS, I.; DOTAS, V.; BOTSOGLOU, E.; NIKOLAKAKIS, I.; BOTSOGLOU, N. Effect of feeding rosemary and a-tocopheryl acetate on hen performance and egg quality. **J. Poult. Sci**., v. 43, n. 2, p. 143-149, 2006.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lípides from animal tissues. **J. Biol. Chem**., Baltimore, v. 726, p. 497-509, 1957.

FONTANA, A.; ANTONIAZZI, F.; CIAVATTA, M. L.; TRIVELLONE, E,; CIMINO, G. 1H-NMR study of cholesterol autooxidation in egg powder and cookies exposed to adverse storage. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 1286–1290, 1993.

FRIEDMAN, M. Food browning and its prevention – an overview, **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 44**,** pp. 631–653, 1996.

FRONING, G. W.; PETERS, D.; MURIANA, P.; ESKERIDGE, K.; TRAVNICEK, D.; SUMMER, S. **International Egg Pasteurization Manual**. Park Ridge, IL: American Egg Board, 2002.

FRONING, G.W. **Egg products indrustry and future perspectives**. In: MINE, Y. Egg bioscience and biotechnology. Hoboken, Chichester: John Wiley, 2008, cap. 8, p. 307-325.

GALOBART, J.; BARROETA, A.C.; BAUCELLS,M.D.; GUARDIOLA, F. Lipid oxi dation in fresh and spray-dried eggs enriched with w3 and w6 polyunsaturated fatty acids during storage as affected by dietary vitamin E and canthaxanthin supplementation. **Poultry Science**, v. 80, p. 327-337, 2001a.

GALOBART, J.; BARROETA, A.C.; BAUCELLS,M.D.; CORTINAS, L.; GUARDIOLA, F. α-tocopheryl transfer efficiency and lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with w3-polyunsaturated fatty acids. **Poultry Science**, v. 80, p. 1496-1505, 2001b.

GALOBART, J.; GUARDIOLA, F.; BARROETA, A.C.; LÓPEZ-FERRER, S.; BAUCELLS, M.D. Influence of dietary supplementation with α-tocopheryl acetate and canthaxanthin on colesterol oxidation in w3 and w6 fatty acids-enriched spray-dried eggs. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 7, p. 2460-2466, 2002.

GRANATO, D.; CASTRO, I. A.; ELLENDERSEN, L. S. N.; MASSON, M. L. Physical Stability Assessment and Sensory Optimization of a Dairy-Free Emulsion Using Response Surface Methodology. **Journal of food science**. v. 75, n. 3, 2010.

GRUNE, T.; KRAMER, K.; HOPPE, P. P.; SIEMS, W. Enrichment of eggs with n-3 polyunsaturated fatty acids: Effects of vitamin E supplementation. **Lipids**. v. 36, n. 8, p. 833-838, 2001.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008. 511p.

GEORGANTELIS, D; BLEKAS, G; KATIKOU, P; AMBROSIADIS, I; FLETOURIS, D. Effect of rosemary extract, chitosan and alfa-tocopherol on lipid oxidation and colour stability during storage of beef burgers. **Meat Science**, 75, 256–264, 2007.

GOMES, F. S.; BORGES, S. V. Efeito das Variáveis no Processo de Extração do Colesterol com Acetona sobre o Teor de Colesterol, Fosfolipídios, Capacidade Emulsificante e Teste de Preferência da Gema Desidratada. **Braz. J. Food Technol**., v. 4, p. 83-87, 2001.

GÓMEZ, M. E. B.; TORRE, J. D.; RODAS, M. A.; MENDONÇA-JUNIOR, C. X.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação sensorial e instrumental de ovos de galinhas alimentadas com rações suplementadas com óleo de linhaça e antioxidantes. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.J. Brazilian Soc. Food Nutr**, São Paulo, SP, v. 23, p.55-66, jun., 2002.

GÓMEZ, M. E. B.; MENDONÇA-JUNIOR, C. X.; MANCINI-FILHO, J. Estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados omega 3, frente a antioxidantes naturales. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences***,* v. 39, n. 4, out./dez., 2003.

GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. Formación de derivados oxidados del colesterol en alimentos. **Graxas Aceites**, Sevilla, v. 45, n. 3, p.164-192, 1994.

GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; MISKIN,D.; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. Oxysterol formation in egg powder and relationship with other quality parameters. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 43, p.1903-1907, 1995.

GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; RAFECAS, M.; GRAU, A.; JORDAN, A.; BOATELL, J. Oxysterol formation in spray-dried egg processed and stored under various conditions: prevention and relationship with other quality parameters. **J. Agric. Food Chem**., v. 25, p. 2229-2243, 1997.

GUARDIOLA, F.; DUTTA, P.C.; CODONY, R.; SAVAGE, G.P. **Cholesterol and phytosterol oxidation products:** Analysis, Occurence and Biological Effects. Champaign: AOCS Press., 2002. 394p.

GUARDIOLA, F.; BOATELLA, J.; CODONY, R. I**n cholesterol and phytosterol oxidation products in foods and biological samples:** Analysis, Occurrence and Biological Effects. GUARDIOLA, F.; DUTTA, P.; SAVAGE, G.P.; CODONY, R. (Eds), AOCS Press, Champaign, IL, p. 50-65, 2002.

GUARDIOLA, F.; GARCIA-CRUSET, S.; BOU, R.; CODONY, R. Artifactual oxidation of cholesterol during the analysis of cholesterol oxidation products: protective effect of antioxidants. **Journal of AOAC International**. v. 87, n. 2, p. 493-497, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. Free radicals and antioxidants in the year. **Annals of the New york Academy of Sciences**. v. 899, p. 136-147, 2000.

HAMILTON-MILLER, J. M. Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis L*.). **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, Washington, v.39, n.11, p. 2375-2377, 1995.

HERMANN, K. Ocurrence and contento f hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids compounds in foods. Crit. Rev. **Food Sci. Nutr**. v. 28, p.315–347, 1989.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Crit Rev Food Sci Nutr**. v. 43, p. 89-143, 2003.

HINO, T.; KAWANISH, S.; YASUI, H.; OKA, S.; SAKURAI. HHTHQ na antilipid-peroxidative compound: its chemical and biochemical characterizations. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1425, p. 47-60, 1998.

HONG, J.; SMITH, T. J.; HO, C. T; AUGUST, D. A; YANG, C. S. Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. **Biochemical Pharmacology**. New York, v. 62, p.1175-1183, Nov. 2001.

HOSSAIN, M. B.; BRUNTON, N. P.; MARTIN-DIANA, A. B.; BARRY-RYAN, C. Application of response surface methodology to optimize pressurized liquid extraction of antioxidant compounds from sage (Salvia officinalis L.), basil (Ocimum basilicum L.) and thyme (Thymus vulgaris L.). **Food Function**. v. 1, p. 269–277, 2010.

HOULIHAN, C. M; HO, C. T.; CHANG, S. S. The structure of rosmariquinone – a new antioxidant isolated from Rosmarinus officinalis L. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. Champaign, v. 62, n. 1, p. 96-99, 1985.

HUBBER, K.C.; PIKE, O.A.; HUBBER, C.S. Antioxidant inhibition of cholesterol oxidation in a spray-dried food system during accelerated storage. **J. Food Sci**. v. 60, n. 5, p. 909-916, 1995.

HUR, S. J.; PARK, G. B.; JOO, S. T. Formation of cholesterol oxidation products (COPS) in animal products. **Food crontrol**. v. 18, n. 8, p. 939-947, 2007.

IBANEZ, E.; KUBATOVA, A.; SENORANS, F. J.; CAVERO, S.; REGLERO, G.; HAWTHORNE, S.B. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 375–382, 2003.

IMAI, H. WERTHESSEN, N. T.; TAYLOR, C. B.; LEE, K. T. Angiotoxicity and atherosclerosis due to contaminants of U.S.P. grade cholesterol. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 100, p. 565-572, 1976.

IMAI, H.; WERTHESSEN, N.T.; SUBRAMANYAM, V.; LEQUESNE, P.W.; SOLOWAY, A.H.; KANISAWA, M. Angiotocity of oxigenated sterols and possible precursors. **Science**. London, v. 207, p. 651-653, 1980.

IMAO, K.; WANG, H.; KOMATSU, M.; HIRAMATSU, M. Free radical scavenging activity of fermented papaya preparation and its effect on lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in ironinduced epileptic foci of rats. **Biol. Mol. Biol. Int**. v. 45, p. 11-23, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - **IBGE** (2012a). Indicadores do IBGE: Estatística da Produção Pecuária. Disponível em: <www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201004_publ_completa.pdf/>Acesso em: 29/06/2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - **IBGE** (2012b). Comentários: Produção da Pecuária Municipal. Disponível em: <www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/comentarios.pdf/> Acesso em: 29/06/2012.

JIANG, Z.; AHN, D.U.; SIM, J.S. Effect of feeding flaxseed and two types of sunflower seed on fatty acid compositions of tolk lipid classes. **Poultry Science.,** v. 70, p. 2467-2475, 1991.

JORGENSEN, K.; SKIBSTED, L.H. Carotenoids scavenging of radical. Effect of carotenoid struture and oxygen partial pressure on antioxidant activity. Z. Lebensm. **Unter Forsch.,** v. 196, n.5, p. 423-429, 1993.

JUNG, S.; HAN, B. H.; NAM, K.; AHN, D. U.; LEE, J. H.; JO, C. Effect of dietary supplementation of gallic acid and linoleic acid mixture or their synthetic salt on egg quality. **Food Chemistry,** v. 129, p. 822–829, 2011.

LABMAQ DO BRASIL LTDA. **Manual de Operações do Mini-Spray Dryer.** Depto de Engenharia, 2003.

LAI, S. M.; GRAY, J. I.; BUCKLEY, D. J.; KELLY, P. M. Influence of Free Radicals and Other Factors on Formation of Cholesterol Oxidation Products in Spray-Dried Whole Egg. **J. Agric. Food Chem**., v. 43, n. 5, p. 1127–1131, 1995.

LANNES, S. C. S.; MEDEIROS, M. L. Processamento de *achocolatado* de cupuaçu por *spray-dryer.* **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 39, n. 1, jan./mar., 2003.

LANNES, S. C. S. **Cupuaçu**: uma abordagem para sua utilização como substituto do cacau. 2008, 144p. Tese de Livre-Docência – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LAMARÃO, R. C.; FIALHO, E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Rev. Nutr**. v. 22, n. 2, Campinas, Mar./Apr., 2009.

LAROSA, G. **Desenvolvimento de produto cárneo de tilápia com antioxidantes naturais**. 2011. 93p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2011.

LEE, J. W.; PARK, K. S.; KIM, J. G.; OH, S. H; KIM, J. H.; BYUN, M. W. Combined effects of gamma irradiation and rosemary extract on the shelf-life of a ready-to-eat hamburger steak. **Radiation Physics and Chemistry,** v. 72, n.1, p.49-56, 2005.

LEE, H. J.; CHO, H. S.; PARK, E.; KIM, S.; LEE, S. Y.; KIM, C. S.; KIM, D. O. K.; KIM, S. J.; CHUN, H. S. Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. **Toxicology**, v. 250, n. 2-3, p. 109-115, 2008.

LERCKER, G.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T., Cholesterol oxidation: presence of 7-ketocholesterol in different food products. **J. Food Compos. Anal.,** Roma, v. 13, p. 625-631, 2000.

LERCKER, G.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T. **Cholesterol oxidation mechanisms**. In Cholesterol and phytosterol oxidation products: Analysis, occurrence, and biological effects (Ed). F Guardiola, PC Dutta, R Codony and GP Savage, p. 1-25. Champaign, Illinois: AOCS Press. 2002.

LIMA, J. D.; MAZZAFERA, P.; MORAES, W. S.; SILVA, R. B. Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 39, n. 4, p.1270-1278, jul, 2009.

LINSEISEN, J., WOLFRAM, G. Absorption of cholesterol oxidation products from ordinary foodstuff in humans. **Ann. Nutr. Metab**., Basel, v. 42, p. 221-230, 1998.

LONGHI, J. G. **Atividade biológica da semente de mucuna pruriens**. Curitiba, 2007, 69p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

LOT, L. R. T.; BROEK, L. V. D.; MONTEBELLO, P. C. B.; CARVALHO, T. B. Mercado de ovos: panorama do setor e perspectivas. In: 43º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Ribeirão Preto-SP. **Anais** do SOBER, p.1-15, 2005.

KAJIYA, K.; HOJO, H.; SUZUKI, M.; NANJO, F.; KUMAZAWA, S.; NAKAYAMA, T. Relationship between antibacterial activity of (+)-catechin derivatives and their

interaction with a model membrane. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 52, n. 6, p.1514−1519, 2004.

KANG, D. K.; KIM, S. T.; CHO, C. H.; YIM, Y. H.; KIM, H. S. Use of Lycopene, an Antioxidant Carotinoid, in Laying Hens for Egg Yolk Pigmentation. **Asian-Aust. J. Anim. Sci**. v. 16, n. 12, p. 1799-1803, 2003.

KIM, S.K.; NAWAR, W.W. Oxidative interaction of cholesterol with triacylglicerols. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 68, p. 931-933, 1991.

KIM, H.; CHOE, E. Effects of egg yolk powder addition to the flour dough on the lipid oxidation development during frying. **LWT**, v. 41, p. 845–853, 2008.

KING, I.B. **Lipids in foods: chemistry and nomeclature**. Handbook of lipids in human nutrition. Boca Raton: CRC Press, 1995. 233p.

KITAHARA, S. E. **Efeito do processamento e da estocagem sobre a formação de óxidos de colesterol em ovos.** 2004. p.80. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

KUBOW, S. Toxicity of dietary lipid peroxidation products. **Trends Food Sci. Technol**. v. 1, p. 67–71, 1990.

KUHLMANN, A.; ROHL, C. Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro cultures of Rosemary (*R. officinalis* L.) and their antiinflamatory effect on lipopolyssacharideactivated microglia. **Pharm. Biol**., v. 44, n. 6, p. 401-410, 2006.

KULISIC, T. A.; RADONIC, B. A.; KATALINIC, C. V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of orégano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p. 633-640, 2004.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R.. Aplicacion de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidant en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

MAERKER, G. Cholesterol autoxidation-current status'. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 64, n. 3, p. 388-392, 1987.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. **Spray Drying and Atomization Overview**. Disponível em:wwww.malvern.com/ProcessEng/processes/spraydrying/overview.htm Acesso em: 13/06/2012.

MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Braz. J. Food Technol**., v. 10, n. 2, p. 96-103, abr./jun. 2007.

MARSHALL, A. C.; SAMS, A. R.; VAN ELSWYK, M. E. Oxidative stability and sensory quality of stored eggs from hens fed 1.5% Menhaden oil. **J. Food Sci**., v. 59, p. 561–563, 1994.

MARSIGLIA, D. A. P. Colesterol: modificações da metodologia oficial do Instituto Adolfo Lutz e sua quantificação em massas alimentícias. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 51-54, 1994.

MARTINEZ, L.; CILLA, I.; BELTRÁN, J. A.; RONCALÉS, P. Antioxidant effect of rosemary, borage, green tea, pu-erh tea and ascorbic acid on fresh pork sausages packaged in a modified atmosphere: Influence of the presence of sodium chloride. **J. Sci Food Agric.,** v. 86, p.1298–1307, 2006.

MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtaneid from residues of different oils seds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., v. 50, p. 3444-3452, 2002.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment**., Campinas, v. 26, n. 2, p. 380-385, abr-jun., 2006.

MAZALLI, M. R.; BRAGAGNOLO, N. Effect of Storage on Cholesterol Oxide Formation and Fatty Acid Alterations in Egg Powder. **J. Agric. Food Chem**., v. 55, p. 2743−2748, 2007.

MAZALLI, M. R.; BRAGAGNOLO, N. Increase of Cholesterol Oxidation and Decrease of PUFA as a Result of Thermal Processing and Storage in Eggs Enriched with n-3 Fatty Acids. **J. Agric. Food Chem**., v. 57, p. 5028–5034, 2009.

MCCARTHY, T. L.; KERRY, J. P.; KERRY, J. F.; LYNCH, P. B.; BUCKLEY, D. J. Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. **Meat Science**., v. 57, p.177−184, 2001a.

MCCARTHY, T. L.; KERRY, J. P.; KERRY, J. F.; LYNCH, P. B.; BUCKLEY, D. J. Evaluation of the antioxidant potential of natural food plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. **Meat Science**, v. 57, p. 45−52, 2001b.

MEDINA, M. K. J. **Óxidos de colesterol em ovo em pó comercial: ocorrência e efeito do processamento e adição de tocoferóis no produto armazenado**. 2009. 117p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

MENDEL, S.; YOUDIM, M. B. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. **Free Radic Biol Med**., v. 37, p. 304-317, 2004.

MERLUZZI, A.; SIRRI, F.; MANFREDA, G.; TALLARICO, N.; FRANCHINI, A. Effects of dietary vitamine E on the quality of table eggs enriched with n-3 long-chain fatty acids. **Poultry science**, v. 79, p. 539-545, 2000.

MILDNER-SZKUDLARZ, S.; ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R.; OBUCHOWSKI, W.; GOSLINSKI, M. Evaluation of Antioxidant Activity of Green Tea Extract and Its Effect on the Biscuits Lipid Fraction Oxidative Stability. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 8, 2009.

MINICH, D. M.; BLAND, J. S.; KATKE, J.; DARLAND, G.; HALL, A.; LERMAN, R. H.; LAMB, J.; CARROLL, B.; TRIPP, M. Clinical safety and efficacy of NG440 a novel combination of rho-isso-alpha acids from hops, rosemary, and oleanolic acid for infl ammatory condition. **Can. J. Physiol. Pharmacol**., v. 85, n. 9, p. 872-883, 2007.

MISSLER, S.R; WASILCHUK, B.A.; MERRIT, C. Separation and identification of cholesterol oxidation products in dried egg preparations. **J. Food Sci**., v. 50, p. 595-600, 1985.

MIURA, K.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Antioxidant activity of chemical components from sage (Salvia officinalis L.) and thyme (Thymus vulgaris L.) measured by the oil stability index method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 7, p. 1845-1851, 2002.

MOHAMED, R.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Antioxidant capacity of extracts from wild and crop plants of the mediterranean region. **J. Food Science**., v. 72, n.1, 2007.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. New York: Wiley, 2000.

MORALES-AIZPURUA, I. C. **Formação de óxidos de colesterol em maionese mantida em diferentes condições de estocagem.** 2001. 127p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MORALES-AIZPURÚA, I.C.; TENUTA-FILHO, A. Óxidos de colesterol: ocorrência em alimentos, formação e efeitos biológicos. **Rev. Bras. Ciênc. Farmac**., São Paulo, v. 38, n. 4, p. 431-442, 2002.

MORALES-AIZPURÚA, I.C.; TENUTA-FILHO, A. Oxidation of cholesterol in mayonnaise during storage. **Food Chemistry**, Barking, v. 89, p. 611-615, 2005.

MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy**., v. 19, n. 1, p. 315-320, Jan./Mar. 2009.

MOREL, D. W.; LIN, C. Y. Cellular biochemistry of oxysterols derived from the diet or oxidation in vivo. **Nutr. Biochem**., New York, v. 7, p. 495-506, 1996.

MORGAN, J.N.; ARMSTRONG, D.J. Formation of cholesterol-5,6-epoxides during spray-drying egg yolk. **J. Food Sci.**, v. 52, p.1224-1227, 1987.

MORGAN, J. N.; ARMSTRONG, D. J. Quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powders spray-drie with direct heating. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 57, n.1, p.43-45, 1992.

MOURA, A. F. P. **Efeito do processamento térmico sobre a ocorrência do 7-cetocolesterol em camarão-rosa.** 1999. 87f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MOURA, S. C. S. R.; GERMER, S. P. M.; ANJOS, V. D. A.; MORI, E. E. M.; MATTOSO, L. H.C.; FIRMINO, A.; NASCIMENTO, C. J. F. Influência dos parâmetros de torração nas características físicas, químicas e sensoriais do café arábica puro. **Braz. J. Food Technol**., Campinas, v. 10, n. 1, p. 17-25, jan./mar. 2007.

MUKHERJEE, J.; SARKAR, D.; SHARMA, A. Effects of dietary consumption of black tea infusion alone and in combination with known clastogens on mouse boné narrow chromosomes *in vivo*. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 657-661, 1997.

NABER, E. C.; BIGGERT, M. D. Analysis for and generation of cholesterol oxidation products in egg yolk by heat treatment. **Poultry Sci**., v. 64, p. 341, 1985.

NAMIKI, M. Antioxidant antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**., v. 29, p. 273–300, 1990.

NASSU, R. T.; GONCALVES, L. A. G.; SILVA, M. A. A. P.; BESERRA, F. J. Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant. **Meat Science.**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 43-49, 2003.

NAWAR, W. W. **Lipids**. FENNEMA, O. R.; DEKKER, M. (Eds): New York, 1985, p. 139.

NAWAR, W. W. Lipids. p. 269 – 382. In: FENNEMA, O. R (Ed). **Química de los alimentos**, Zaragosa: Editoral Acribia S. A., 2000, 1258p.

NIELSEN, H. Production of phospholipids from spray-dried egg yolk by consecutive in situ solid phase extraction with acetone and ethanol. **LWT**, v. 40, p. 1337–1343, 2007.

NIKKI, E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? **Nutrition**, v. 18, p. 524-525, 2002.

NOUROOZ-ZADEH, J.; APPELQVIST, L. A. Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: fresh eggs and dehydrated egg products. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 52, n. 1, p. 57-67, 1987.

OBARA, A.; OBIEDZINSKI, M.; KOLCZAK, T. The effect of water activity on cholesterol oxidation in spray-dried and freeze-dried egg powders. **Food Chem**., v. 95, p. 173-179, 2006.

OHATA, S. M.; VIOTTO, L. A. Comportamento reológico de constituintes do ovo. **Braz. J. Food Technol**., Campinas, v. 14, n. 1, p. 10-18, jan./mar. 2011.

OLIVEIRA, H. C. F., QUINTÃO, E. C. R. Colesterol na aterogênese. In: QUINTÃO, E.C.R**. Colesterol na aterogênese**, Rio de Janeiro: Quality Mark, 1992. cap. 3, p. 47-55.

OMWAMBA, M.; HU, Q. Antioxidant capacity and antioxidative compounds in barley (Hordeum vulgare L.) grain optimized using response surface methodology in hot air roasting. **Eur Food Res Technol**., v. 229, p. 907–914, 2009.

OSADA, K.; KODAMA, T.; CUI, L.; YAMADA, K., SUGANO, M. Levels and formation of oxidized cholesterol in processed marine. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 41, p. 1893-1998, 1993.

OSADA, K.; SASAKI, M. Lymphatic absorption of oxidized cholesterol in rats. **Lipids**, Champaign, v. 29, n. 8, p. 555-559, 1994.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLONAGEN, 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. 2914-2919, 2002.

OWUOR, P. O.; OBANDA, M.; NYIRENDA, H. E.; MPHANGWE, N. I. K.; WRIGHT, L. P.; APOSTOLIDES, Z. The relationship between some chemical parameters and sensory evaluations for plain black tea (*Camellia sinensis*) produced in Kenya and comparison with similar teas from Malawi and South Africa. **Food chemistry**, London, v. 97, n. 4, p. 644-653, 2006.

PANIANGVAIT, P.; KING, A. J.; JONES, A. D.; GERMAN, B. G. Cholesterol oxides in foods of animal origin. A critical rewiew. **J. food sci**., Chicago, v. 60, n. 6, p.1159-1174, 1995.

PASCOAL, L. A. F.; BENTO, J. R.; SANTOS, W. S.; SILVA, R. S.; DOURADO, L. R. B.; BEZERRA, A. P. A. Qualidade de ovos comercializados em diferentes estabelecimentos na cidade de Imperatriz- MA. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal,** Salvador, v. 9, n. 1, p. 150-157, 2008.

PAUCAR-MENACHO, L. M.; SILVA, L. H.; BARRETTO, P. A. A.; MAZAL, G. FAKHOURI, F. M.; STEEL, C. J.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. Desenvolvimento de massa alimentícia fresca funcional com a adição de isolado protéico de soja e polidextrose utilizando páprica como corante. **Ciênc. Tecnol. Alimentos.**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 767-778, 2008.

PEARSON, D. A.; FRANKEL, E. N.; AESCHBACH, R.; GERMAN, J. B. Inhibition of endothelial cellmediated oxidation of low-density lipoprotein by rosemary and plant phenolics. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, n. 3, p. 578-582, 1997.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J.E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, out./dez., 2008.

PELLEGRINO, L.; RESMINI, P.; LUF, W. Assessment (indices) of heat treatment of milk. In: P.F. Fox, Editor, **Heat-induced changes in milk**, IDF, Brussels, Belgium, p. 409–453, 1995.

PENG, S.; HU, B.; MORIN, R.J. Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. **J. Clin. Lab. Anal.**, New York, v. 5, p.144-152, 1991.

PENAZZI, G.; CABONI, M. F.; ZUNIN, P.; EVANGELISTI, F.; TISCORNIA, E.; TOSCHI, T.G.; LERCKER, G. Routine high-performence liquid chromatographic determination of free 7-ketocholesterol in some foods by two different analytical methods, **J. Am. Oil Chen. Soc**, Champaign, v. 72, n. 2, p. 1523-1527, 1995.

PÉREZ-FONS, L.; ARANDA, F. J.; GUILLÉN, J.; VILLALAÍN, J.; MICOL, V. Rosemary *(Rosmarinus offi cinalis)* diterpenes affect lipid polymorphism and fl uidity in phospholipid membranes. **Arch. Biochem. Biophys**. v. 453, n. 2, p. 224-236, 2006.

PEREIRA, M. G. **Aplicação de antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de ave**. 2009. 126p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2009.

PERUMALLA, A.V.S.; NAVAM. S. H. Green tea and grape seed extracts — Potential applications in food safety and quality. **Food Research International**. v. 44, p. 827–839, 2011.

PIE, J.E.; SPAHIS, K.; SEILLAN, C. Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. **J. Agric. Food Chem**. Columbus, v. 38, p. 973-979, 1990.

PIE, J. E.; SPAHIS, K.; SEILLAN, C. Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. **J. Agric. Food Chem.** Columbus, v. 39, p. 250-254, 1991.

PIEDADE, K.R. **Uso de Ervas Aromáticas na Estabilidade Oxidativa de Filés de Sardinha (*Sardinella brasiliensis*) processados**. 2007, 70p. Tese (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

PIKE, O. A.; PENG, I. C. Stability of shell egg and liquid yolk to lipid oxidation. **Poultry Sci.** v. 64, p.1470–1475, 1985.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Quim. Nova**, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.

PIRONEN, V.; TOIVO, J.; LAMPI, A.M. New data for cholesterol contents in meat, fish, Milk, eggs and their products consumed in Finland. **J. Food Compos. Anal**., San Diego, v. 15, p. 705-713, 2002.

PITA, M. C. G.; PIBER-NETO, E.; NAKAOKA, L. M.; MENDONÇA-JUNIOR, C. X. Efeito da adição de ácidos graxos insaturados e de vitamina E à dieta de galinhas e seu reflexo na composição lipídica e incorporação de α-tocoferol na gema do ovo. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 41, n. 1, p. 25-31, 2004.

PIZZALE, L.; BORTOLOMEAZZI, R.; VICHI, S.; BEREGGER, E.; CONTE, L.S. Antioxidant activity of sage (Salvia officinalis and S. fruticosa) and oregano (Origanum onites and O. indercedens) extracts related to their phenolic compound content. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 1645–1651, 2002.

PRASAD, M. M.; SEENAYYA, G. Effect of spices on the growth of red halophilic cocci isolated from salted cured fi sh and solar salt. **Food Res. Intern**., v. 33, n. 9, p. 793-798, 2000.

PRADO, C. C.; ALENCAR, R. G; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Avaliação do teor de polifenóis da *camellia sinensis* (chá verde). **Revista Eletrônica de Farmácia,** Suplemento. v. 2, n. 2, p.164-167, 2005.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry,** v. 269, n. 2, p. 337–341, 1999.

PRITZKER, J. Hygroscopicity and spoilage of dry egg power. **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene,** v. 35, p. 341-344, 1994.

PUKALSKAS, A.; BEEK, T. A.; WAARD, P. Development of a triple hyphenated HPLC-radical scavenging detection–DAD-SPE-NMR system for the rapid identification of antioxidants in complex plant extracts. **Journal of Chromatography.** Amsterdan, v. 1074, n. 1-2, p. 81-88, 2005.

QUI, G.H.; SIM, J.S. Natural tocopherol enrichment its effect in n-3 fatty acid modified chicken eggs. **Journal of Agriculture Food Chemistry,** v. 46, p. 1920-1926, 1998.

RACANICCI, A. M. C.; DANIELSEN, B.; MENTEN, J. M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant effect of dittany (*Origanum dictamnus*) in pre-cooked chicken meat balls during chill-storage em comparison to rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **European Food Research and Tecnology**, Berlin, v. 218, p. 521-524, 2004.

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

RANKIN, S. A; PIKE, O. A. Cholesterol Autoxidation Inhibition Varies Among Several Natural Antioxidants in an Aqueous Model System. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 3, p. 653-655, 1993.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2004.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, P. G.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative anti-oxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research.**, Chur, v. 22, p. 375-388, 1995.

ROSENBLAT, M.; VOLKOVA, N.; COLEMAN, R.; ALMAGOR, Y.; AVIRAM, M. Antiatherogenicity of extra virgin olive oil and its enrichment with green tea polyphenols in the atherosclerotic apolipoprotein-E-deficient mice: enhanced macrophage cholesterol efflux. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, p. 514−523, 2008.

ROJAS, E. G.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; FREITAS, J. F. Cholesterol removal in liquid egg yolk using high methoxyl pectins. **Carbohydrate Polymers.** v. 69, p. 72–78, 2007.

ROSA, E. D.; TSUKADA, M.; FREITAS, L. A. P. **Secagem por atomização na indústria alimentícia:** fundamentos e aplicações Disponível em: http://www.fcf.usp.br/ensino/graduacao/disciplinas/exclusivo/inserir/anexos/linkanexos/secagem%20de%20materiais.pdf/ Acesso em: 07/06/2010.

RUAN, J.; GERENDÁS, J.; ROLF HÄRDTER, R.; SATTELMACHER, B. Effect of root zone pH and form and concentration of nitrogen on accumulation of quality-related components in green tea. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, n. 8, p.1505-1516, 2007.

RUSSO, G.L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, p. 937–946, 2009.

SAHA, J; DEBNATH, M.; SAHA, A.; GHOSH, T.; SARKAR, P. Response surface optimisation of extraction of antioxidants from strawberry fruit, and lipid peroxidation inhibitory potential of the fruit extract in cooked chicken patties. **J Sci Food Agric.,** v. 91, p. 1759–1765, 2011.

SANCHEZ-ESCALANTE, A.; DJENANE, D.; TORRESCANO, G.; BELTRAN, J. A.; RONCALES, P. The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and Rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. **Science***.* v. 58, n. 4, p. 421-429, 2001.

SANDER, B.D.; SMITH, D.E.; ADDIS, P.B.; PARK, S.W. Effects of prolonged and adverse storage conditions on levels of cholesterol oxidation products in dairy products. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 54, n. 4, p. 874-879, 1989a.

SANDER, B.D.; ADDIS, P.B.; PARK, S.W.; SMITH, D.E. Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. **J. Food Prot**., Des Moines, v. 52, n. 2, p.109-114, 1989b.

SANTANA, L. S.; MANCINI-FILHO, J. Influence of the addition of antioxidants in vivo on the fatty acid composition of fish fillets. **Food Chemistry.**, Oxford, v. 68, p. 175-178, 2000.

SANTOS, L. D.; ZARA, R. F.; VISENTAINER, J. V.; SOUZA, N. E.; SOUZA FRANCO, M. L. R. Avaliação Sensorial e Rendimento de Filés Defumados de Tilápia (*Oreochromis Niloticus* Linnaeus, 1757) na Presença de Alecrim (*Rosmarinus Officinalis*). **Ciência e Agrotecnologia.**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 406-412, mar./abr., 2007.

SARTORI E. V.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; CRUZ, S. H.; GAZIOLA, S. A. Concentração de proteínas em gemas de ovos de poedeiras (Gallus gallus) nos diferentes ciclos de postura e sua interferência na disponibilidade do ferro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 481-487, jul-set., 2009.

SARANTINOS, J.; O'DEA, K.; SINCLAIR, A.J. Cholesterol oxides in Australian foods identification and quantification. **Food Aust.**, North Sydney, v. 45, n. 10, p. 485-490, 1993.

SAS INSTITUTE. SAS software: application of statistical tests through release 6.12. Cary: Statistical Analysis System Institute, 1997.

SCHMITZ, W; SAITO, A.Y; ESTEVÃO, D; SARIDAKIS, H.O. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. **Semin Cienc Biol Saude.,** v. 26, p. 119-130, 2005.

SCHWARZ, K.; BERTELSEN, G.; NISSEN, L. R.; GARDNER, P.T.; HEINONEN, M. I.; HOPIA, A.; HUYNH-BA, T.; LAMBELET, P.; MCPHAIL, D.; SKIBSTED, L. H.; TIJBURG, L. Investigation of plants extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. **European food research and technology**, v. 212, n. 3, p. 319-328, 2001.

SEBRING, M. **Desugarization of egg products**. In: STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. (Eds.), Egg science and technology. 4th ed., 1995, p. 323–334, cap. 13. Binghamton, NY: Food Product Press.

SENGER, A. E. V.; SCHWANKE, C. H. A.; GOTTLIEB, M. G. V. Chá verde (Camellia sinensis) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. **Scientia Medica**. Porto Alegre, v. 20, n. 4, p. 292-300, 2010.

SERON, V. D.; FURLAN, M. M. D. P. Papel do chá verde e seus componentes no tratamento do diabetes mellitus tipo. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 3, p. 379-383, set./dez., 2010.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 20, p. 7749-7759, 2005.

SHIZUCHI, S.; HAYASE, F. Antioxidative activity of the blue pigment formed in a DD -xylose–glycine reaction system. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, p. 54–59, 2003.

SHIOKAZI, T.; SUGIYAMA, K.; NAKAZATO, K.; TAKEO, T. Effects of tea extract, catechins and caffeine against type I allergic reaction. **Yakuzaku Zasshi**, Tokyo, v. 117, p. 448-454, 1997.

SHINODA. **Processo de qualidade dos ovos**. Disponível em: <http://www.shinoda.com.br> Acessado em: 19/03/2011.

SILVA, A. M. O. **Efeito os compostos fenólicos presentes no alecrim (Rosmarinus offi cinalis L.) sobre as enzimas antioxidantes e os parâmetros bioquímicos de ratos diabéticos.** 2008. 88 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SILVEIRA, R. F. M. **Atividades biológicas de xilana de sabugo de milho**. Natal, 2010, 86p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Biociências - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

SIM, J. S. Desinger eggs and their nutrition and functional significance. **World Rev. Nutr. Diet.,** New York, v. 83, p. 89-101, 1998.

SIMIC, M. G., JAVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. *In:* HO, C.T., OSAWA, T., HUANG, T.M., ROSEN, R.T. (Ed.). **Food phytochemicals for cancer prevention***.,* Washington: American Chemical Society, 1994. p. 20-33. (ACS Symposium Series, n.546).

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia, da Planta ao Medicamento**. Editora da UFRGS/Editora da UFSC, Porto Alegre Florianópolis, 5ª edição, 2004.

SINGH, S; SINGH, R.P. *In vitro* methods of assay of antioxidants: An overview. **Food Review International.**, v. 24, p. 392-415, 2008.

SMITH, L.L. **Cholesterol autoxidation**. Plenum Press, New York, 1981.

SMITH, L.L. Cholesterol autoxidation. **Chem. Phys. Lipids**, Shannon, v. 44, p. 87-125, 1987.

SMITH, L. L.; JOHNSON, H. Biological activities of oxysterols. **Free Radical Biol. Med**., New York, v. 7, p. 285-332, 1989.

SMITH, J. S.; ALFAWAZ, M. Antioxidative activity of Maillard reaction-products in cooked ground-beef sensory and TBA values. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 234–239, 1995.

SMITH, L. L. Cholesterol autoxidation. Plenum, p.49-123,1981. Apud: SMITH, L. L. Review of progress in sterol oxidation: 1987 – 1995. **Lipids**, Champaign, v. 31, n. 5, p.453 – 487, 1996.

STEFANELLO, C. Análise do sistema agroindustrial de ovos comerciais. **Revista Agrarian.,** Dourados, v. 4, n. 14, p. 375-382, 2011.

SOHOVOS. **Produção e processo de ovo pasteurizado**. Disponível em: <http://www.sohovos.com.br/> Acesso em: 19/07/2011.

SOMAI NORDESTE. **Ovo Líquido pasteurizado**. Disponível em: <http://www.somainordeste.com.br> Acessado em: 19/03/2011.

SOUSA, C. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim Nova.,** v. 30, p. 351-355, 2007.

SURAI, P. F.; SPARKS, N. H. C. Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. **Trends in Food Scienc. & Technology**, v. 12, p. 7-16, 2001.

TAKEMOTO, E.; TEXEIRA FILHO, J.; GODOY, H. T. Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. **Quim. Nova**, v. 32, n. 5, p. 1189-1194, 2009.

TAI, C.Y.; CHEN, Y.C.; CHEN, B.H. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: An overview (Part I). **J. Food Drug Anal.**, Nankang, v.7, n. 4, p.243-257, 1999.

TAI, C.Y.; CHEN, Y.C.; CHEN, B.H. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: an overview (Part II). **J. Food Drug Anal***.,* Nankang, v.8, n.1, p.1-15, 2000.

TERNES, W.; LEITSCH, S. **Chemistry of egg yolk**. *in*: Proceedings of the VII European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products. Poznan, Poland. WPSA Polish Branch, Poznan, Poland. p. 127–144, 1997.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. Piracicaba, 2010. 102p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

THUNGMANEE, N.; INTARAPICHET, K.; THAIUDOM, S. Effects of spray-drying parameters on water activity, color, and oxidation of whole egg powder. In: **The 9th Agro-Industrial Conference**, Thailand, 2007.

TREVISANATO, S. I.; KIM, Y. I. Tea and Health. **Nutrition Reviews**, New York, v. 58, p.1-10, Jan, 2000.

TORALLES, R. P.; VENDRUSCOLO, J. L.; VENDRUSCOLO, C. T.; BURKERT, F. A.; DEL PINO; ANTUNES, P. L. Controle da atividade da polifenoloxidase de pêssego por interação do pH, da temperatura e da concentração de ácido ascórbico. **Braz. J. Food Technol**., Campinas, v. 13, n. 2, p. 120-127, abr./jun. 2010.

TRINDADE, R. A. **Influencia de antioxidantes naturais no perfil lipídico de hambúrgueres bovinos submetidos à irradiação por ^{60}CO e aceleradores de elétrons**. 2007. 111p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de pesquisas energéticas e nucleares – IPEN, São Paulo, 2007.

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

TSAI, L. S., HUDSON, C. A. Cholesterol oxides in commercial dry egg products: isolation and identification. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 49, p. 1245-1248, 1984.

TSAI, L.S.; HUDSON, C.A. Cholesterol oxides in commercial dry egg products: quantitation. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 229-231, 1985.

TOMPKINS, C.; PERKINS, E. G. Frying performance of low-linolenic acid soybean oil. **Journal American Oil Chemistry Society**, Chicago, v. 77, n. 3, p. 223-229, 2000.

UBA, **União Brasileira de Avicultura**. Relatório Anual 2009. 40p. Disponível em:<http://www.uba.org.br.html> Acesso em: 30/09/2010.

ULBERTH, F.; BUCHGRABER, M. **In cholesterol and phytosterol oxidation products in foods and biological samples**: Analysis, Occurrence and Biological Effects. GUARDIOLA, F.; DUTTA, P.; SAVAGE, G.P.; CODONY, R. (Eds), AOCS Press, Champaign, IL, p. 26-49, 2002.

USDA, National Nutrient Database for Standard Reference, Release 22, 2008. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search>. Acesso em: 1/07/2011.

VALENZUELA, A.; SANHUEZA, J.; NIETO, S. Cholesterol oxidation: health hazard and the role of antioxidants in prevention. **Biol. Res**., v. 36, p. 291-302, 2003.

VINE, D. F.; CROFT, K. D.; BEILIN, L. J.; MANO, J. C. L. A. Absorption of dietary cholesterol oxidation products and incorporation into rat lymph chylomicrons. **Lipids**, Champaign, v. 32, n. 8, p. 887-893, 1997.

VUONG, Q. V.; STATHOPOULOS, C. E.; GOLDING, M. B.; ROACH, P. D. Isolation of Green tea catechins and their utilization in the food industry. **Food Reviews International**, v. 27, p. 227-247, 2011.

VYNCKE, B.W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloracetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette Seifen Anstrichmittbl**, Leinfelden, v. 72, n.12, p.1084-1087, 1970.

ZHANG, Q.; ZHANG, J.; SHEN, J.; SILVA, A.; DENNIS, D. A.; BARROW, C. J. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenolcontent in seaweeds. **Journal of Applied Phycology**., v. 18, p. 445–450, 2006.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001.

ZUNIN, P.; EVANGELISTI, F.; CABONI, M. F.; PENAZZI, G.; LERCKER, G.; TISCORNIA, E. Cholesterol oxidation in Baked foods containing fresh and powdered eggs. **J. Food Sci**., Chicago, v. 60, n. 5, p. 913-916, 1995.

YANG, S.C.; WANG, Z. Tea and cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 85, n. 13, p. 1038- 1049, 1993.

WAHLE, K.W. J; HOPPE, P.P; MCINTOSH, G. Effects of storage and various intrinsic vitamin E concentrations on lipid oxidation in dried egg powders. **J. Sci. Food Agric**., v. 61, p. 463-469, 1993.

WANG, R.; ZHOU, W. Stability of tea catechins in the breadmaking process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., v. 52, p. 8224−8229, 2004.

WARTHA, E. R. S. A; SILVA, A. M. O; LIMA, A.; FILHO, J. M. Efeito dos ácidos fenólicos com atividade antioxidante sobre o metabolismo lipídico de ácidos graxos poliinsaturados. BIO-FARMA – Ver. Téc. Cient.Farm. **Bioquim. Anál. Clín. Toxicol**., v. 1, n. 3, p. 202 – 213, 2006.

WASOWICZ, E.; GRAMZA, A.; HES, M.; JELEN, H. Oxidation of lipids in food. **Pol. J. Food Nutr. Sci**., v. 13, n. 54, p. 87–100, 2004.

WATKINS, B.A. The nutritive value of the egg. In: STADELMAN, W.J.; COTTERILL, O.J. (Ed). **Egg science and technology**, 4th ed., Food Product Press, Binghamton, NY, p. 177–194, 1995.

WENZEL, M.; SEUSS –BAUM, I.; SCHLICH, E. Influence of Pasteurization, Spray- and Freeze-Drying, and Storage on the Carotenoid Content in Egg Yolk. **J. Agric. Food Chem**., v. 58, p. 1726–1731, 2010.

WU, W.; CLIFFORD, M.; HOWELL, N. K. The effect of instant green tea on the foaming and rheological properties of egg albumen proteins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 87, p. 1810–1819, 2007.

WU, Y.; LI, L.; DUAN, Z.; YANG, X.; SHANG, J.; CHEN, S. Application of Response Surface Methodology to Optimise Preparation High Antioxidant Activity Product from Pinctada Fucata Muscle. **Advanced Materials Research**, v. 396-398, p. 1341-1348, 2012.

ANEXOS

CULTURES DIVISION
food.protection@danisco.com
www.danisco.com

Válido a partir de: 12 de abril de 2011

DANISCO
First you add knowledge...

DESCRIÇÃO DE PRODUTO - PD 50137-7.2PT

Código do material 173351

GUARDIAN™ Rosemary Extract 08

Fat soluble; 10 kg

Descrição

GUARDIAN™ Rosemary Extract 08 compreende extrato de alecrim e veículo de grau alimentício.

GUARDIAN™ Rosemary Extract 08 é solúvel em óleos e gorduras, mas insolúvel em água.

Áreas de aplicação

Óleos e gorduras vegetais e animais, óleos para fritura, shortenings, margarinas e similares, produtos panificados, snacks e produtos similares.

Benefícios potenciais

- Melhora do produto devido ao retardamento da oxidação lipídica
- Maior validade de óleos e gorduras e de produtos processados
- Qualidade consistente
- Excelente efeito de fluidez
- Distribuição uniforme de extrato de alecrim devido ao veículo presente
- Documentação técnica da DuPont Nutrition Biosciences ApS sobre os benefícios potenciais pode ser disponibilizada sob solicitação.

Dosagens

A dose recomendada de GUARDIAN™ Rosemary Extract 08 está na faixa de 200-1000 ppm. A dose exata não pode ser estabelecida pois depende do conteúdo de gordura/óleo do produto onde será utilizada.

Instruções de uso

Aplicar GUARDIAN™ Rosemary Extract 08 ao produto diretamente ou em uma solução em óleo ou gordura por spray, mergulhando, misturando ou por injeção.

Utilizando uma pré-solução:
Adicionar 1 g de GUARDIAN™ Rosemary Extract 08 (20-80°C) à pelo menos 9 g de gordura fundida ou óleo (60-80°C), agitando vagarosamente. Mantenha a temperatura e continue agitando vagarosamente até que GUARDIAN™ Rosemary Extract 08 esteja completamente dissolvido.

Diretamente:
Adicione a quantidade calculada de GUARDIAN™ Rosemary Extract 08 (20-70°C) à gordura fundida ou óleo (20-70°C), agitando vagarosamente. Manter a temperatura e continuar agitando vagarosamente até que GUARDIAN™ Rosemary Extract 08 esteja completamente dissolvido.

Se uma solução mais fraca for necessária, diluir mais com gordura fundida ou óleo (20-80°C). Agitar até que a solução esteja homogênea.

Composição

GUARDIAN™ Rosemary Extract 08 é composto por:

Extrato de alecrim
(INS392)
Mono- e diglicerídeos de
ácidos graxos (E471)
Éster de ácido acético de
mono e diglicerídeos (INS
472a)
e
Propileno glicol (E1520)

As informações contidas nesta publicação baseiam-se em nosso próprio trabalho de pesquisa e de desenvolvimento e são de nossa total confiança. Entretanto, os usuários devem realizar seus próprios testes para determinar a adequação de nossos produtos a seus fins específicos e as situações jurídicas de uso do produto. As declarações aqui contidas não devem ser consideradas como garantia de qualquer tipo, expressa ou implícita, e não assumimos nenhuma responsabilidade legal pela infração de qualquer patente.

CULTURES DIVISION
food.protection@danisco.com
www.danisco.com

Válido a partir de: 12 de abril de 2011

DANISCO
First you add knowledge...

DESCRIÇÃO DE PRODUTO - PD 50137-7.2PT

Código do material 173351

GUARDIAN™ Rosemary Extract 08

Fat soluble; 10 kg

Especificações físico-químicas

Ácido carnósico	2.7 - 3.3 %
Total de ácido carnósico e carnosol	3.8 - 4.7 %
Diterpenos fenólicos*	4.0 - 4.7 %
Forma à 25°C	líquido
Cor	marrom

*Total de ácido carnósico, carnosol e ácido 12-metóxi-carnósico
Variações de cor podem ocorrer de lote para lote.

Estocagem

Condições:
Armazenar sem abrir entre 15-25°C.

Quando aberto, armazenar entre 15-25°C em embalagem original.

GUARDIAN™ Rosemary Extract 08 é uma solução concentrada e consequentemente pode formar precipitados ou sólidos durante a estocagem prolongada, especialmente a baixas temperaturas. Se isso acontecer, fundir novamente o GUARDIAN™ Rosemary Extract 08 a 50-70°C e misturá-lo ou agitá-lo antes de usar.

Validade:
Validade é de 18 meses quando estocado de acordo com as recomendações.

Embalagem

GUARDIAN™ Rosemary Extract 08 está disponível em bombonas de polietileno, peso líquido 10 kg. Outras formas de embalagem estão disponíveis se solicitadas.

Pureza e legislação

Nos Estados Unidos, o extrato de alecrim é classificado como GRAS para uso geral em alimentos sob o número 21 CFR 182.20. O extrato de alecrim se encaixa na definição de "flavorizante natural" e deve ser rotulado de acordo.
Na UE o extrato de alecrim pode ser rotulado como antioxidante; extrato de alecrim ou antioxidante; INS 392.

Legislação local alimentícia e/ou de ração animal deve ser sempre consultada relacionado ao status deste produto, já que legislação referente ao uso deste em alimentos ou ração animal pode variar dependendo do país. Aconselhamento referente ao status legal deste produto está disponível sob requisição.

Segurança e manuseio

Uma Ficha de Segurança de Produtos Químicos está disponível se requisitada.

País de origem

Dinamarca

Status Kosher

Este produto é certificado pela União Ortodoxa como kosher pareve.

Status Halal

Este produto é certificado Halal pelo Halal Food Council of Europe e IFANCA internacional.

As informações contidas nesta publicação baseiam-se em nosso próprio trabalho de pesquisa e de desenvolvimento e são de nossa total confiança. Entretanto, os usuários devem realizar seus próprios testes para determinar a adequação de nossos produtos a seus fins específicos e as situações jurídicas de uso do produto. As declarações aqui contidas não devem ser consideradas como garantia de qualquer tipo, expressa ou implícita, e não assumimos nenhuma responsabilidade legal pela infração de qualquer patente.

CULTURES DIVISION
food.protection@danisco.com
www.danisco.com

Válido a partir de: 12 de abril de 2011

DANISCO
First you add knowledge...

DESCRIÇÃO DE PRODUTO - PD 50137-7.2PT

Código do material 173351

GUARDIAN™ Rosemary Extract 08

Fat soluble; 10 kg

Status GMO

De acordo com a legislação CE nos. 1829/2003 e 1830/2003:

As matérias-primas e coadjuvantes de processo utilizados na produção deste produto não contêm ou consistem em OGMs, e não são produzidos a partir de OGMs.

Questionário foi utilizado como documentação.

Alergênicos

A tabela abaixo indica a presença (como componente adicionado) dos seguinetes alergênicos e productos destes:

Sim	Não	Alergênicos	Descrição dos componentes
	X	trigo	
	X	outros cereais que contêm glúten	
	X	Crustáceos	
	X	Ovos	
	X	Peixe	
	X	Amendoim	
	X	Soja	
	X	Leite (incluindo lactose)	
	X	Nozes	
	X	Aipos	
	X	Mostarda	
	X	Sementes de gergelim	
	X	Dióxido de enxofre e sulfitos (>10 mg/kg)	
	X	Tremoço	
	X	Moluscos	

Legislação local referente a requisitos legais de rotulagem de alergênicos deve ser sempre consultada já que pode haver variações com dependendo do país.

As informações contidas nesta publicação baseiam-se em nosso próprio trabalho de pesquisa e de desenvolvimento e são de nossa total confiança. Entretanto, os usuários devem realizar seus próprios testes para determinar a adequação de nossos produtos a seus fins específicos e as situações jurídicas de uso do produto. As declarações aqui contidas não devem ser consideradas como garantia de qualquer tipo, expressa ou implícita, e não assumimos nenhuma responsabilidade legal pela infração de qualquer patente.

CULTURES DIVISION
food.protection@danisco.com
www.danisco.com

Válido a partir de: 21 de maio de 2010

DANISCO
First you add knowledge...

DESCRIÇÃO DE PRODUTO - PD 215033-5.4PT

Código do material 1219236

GUARDIAN™ Green Tea Extract 20M

20 kg

Descrição

GUARDIAN™ Green Tea Extract 20M é um extrato natural de chá verde e tem a maltodextrina como veículo. O produto exibe o sabor, o aroma e a atividade antioxidante característicos do extrato de chá verde.

Áreas de aplicação

Margarina e spreads, carnes, aves, mariscos e produtos similares

Benefícios potenciais

- Melhora do produto devido ao retardamento da oxidação lipídica
- Vida útil mais longa de produtos processados
- Qualidade consistente
- Excelente alternativa para antioxidantes baseados em BHA e BHT e rosemary extract
- Excelente efeito de fluidez
- Distribuição uniforme de extrato de chá verde devido ao veículo presente

Dosagens

A dosagem recomendada de GUARDIAN™ Green Tea Extract 20M está na faixa de 100-500 ppm (100-500 g por tonelada métrica). A dosagem exata não pode ser estabelecida já que depende do conteúdo de óleo/gordura do produto.

Instruções de uso

Adicionar GUARDIAN™ Green Tea Extract 20M à fase aquosa, onde se dissolverá. Se nenhuma fase aquosa estiver presente, pré-misture GUARDIAN™ Green Tea Extract 20M com outros ingredientes secos.

Composição

Extrato de chá verde
(20 % catequinas)
e
Maltodextrina

Especificações físico-químicas

Forma à 25°C	pó
Cor	pêssego claro

Variações de cor podem ocorrer de lote para lote.

Dados nutricionais

Valores aproximados para rotulagem nutricional por 100 g.

Energia	99 Calorias/100g
Proteína	1.9 g/100g
Carbohidrato	23.0 g/100g
- dos quais açúcares	13.0 g/100g
Gordura	< 0.1 g/100g
Cinzas	71.3 g/100g
Umidade	3.8 g/100g
Sódio total	140 mg/100g

Estocagem

Condições:
Armazenar a embalagem fechada em temperatura máxima de 25° em embalagem original, longe de umidade, longe da luz solar direta e de produtos com odor forte.

Quando aberto, armazenar em temperatura máxima de 25° em embalagem original, longe de umidade, longe da luz solar direta e de produtos com odor forte.

Validade:
Validade é de 18 meses quando estocado de acordo com as recomendações.

As informações contidas nesta publicação baseiam-se em nosso próprio trabalho de pesquisa e de desenvolvimento e são de nossa total confiança. Entretanto, os usuários devem realizar seus próprios testes para determinar a adequação de nossos produtos a seus fins específicos e as situações jurídicas de uso do produto. As declarações aqui contidas não devem ser consideradas como garantia de qualquer tipo, expressa ou implícita, e não assumimos nenhuma responsabilidade legal pela infração de qualquer patente.

CULTURES DIVISION
food.protection@danisco.com
www.danisco.com

Válido a partir de: 21 de maio de 2010

DANISCO
First you add knowledge...

DESCRIÇÃO DE PRODUTO - PD 215033-5.4PT

Código do material 1219236

GUARDIAN™ Green Tea Extract 20M

20 kg

Embalagem

GUARDIAN™ Green Tea Extract 20M está disponível em embalagens de 20 kg laminadas, sacos de alumínio selados em caixa.
Outras formas de embalagem estão disponíveis se solicitadas.

Pureza e legislação

Nos Estados Unidos, extrato de chá verde é reconhecido como seguro (GRAS) para uso como aromatizante de grau alimentício sob 21 CFR 182.20.

Na UE, extrato de chá verde está aprovado para uso como aromatizante natural.

Legislação local alimentícia e/ou de ração animal deve ser sempre consultada relacionado ao status deste produto, já que legislação referente ao uso deste em alimentos ou ração animal pode variar dependendo do país. Aconselhamento referente ao status legal deste produto está disponível sob requisição.

Segurança e manuseio

Uma Ficha de Segurança de Produtos Químicos está disponível se requisitada.

País de origem

Dinamarca

Status Kosher

Este produto é certificado pela União Ortodoxa como kosher pareve.

Status Halal

Este produto é certificado Halal pelo The Islamic Food and Nutrition Council of America - IFANCA.

Status GMO

De acordo com a legislação CE nos. 1829/2003 e 1830/2003:

As matérias-primas e coadjuvantes de processo utilizados na produção deste produto não contêm ou consistem em OGMs, e não são produzidos a partir de OGMs.

Questionário foi utilizado como documentação.

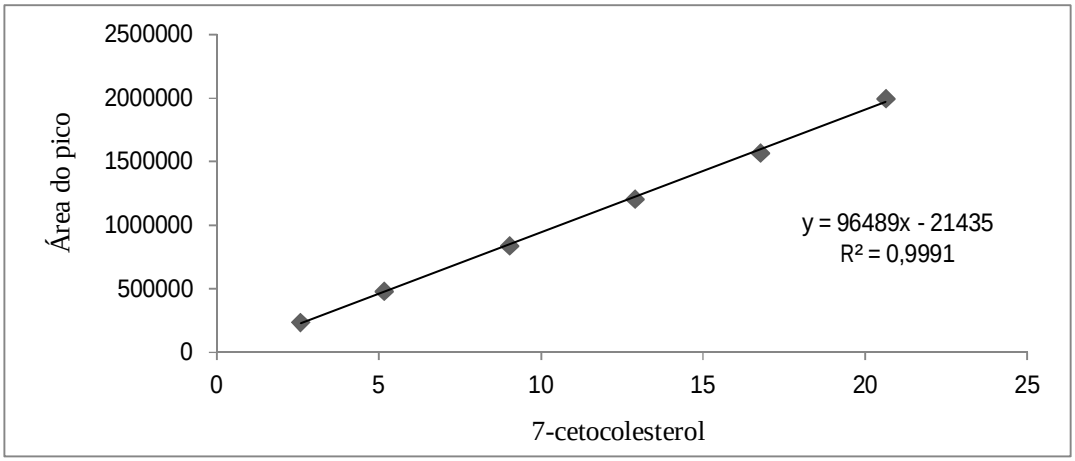
Alergênicos

A tabela abaixo indica a presença (como componente adicionado) dos seguinetes alergênicos e productos destes:

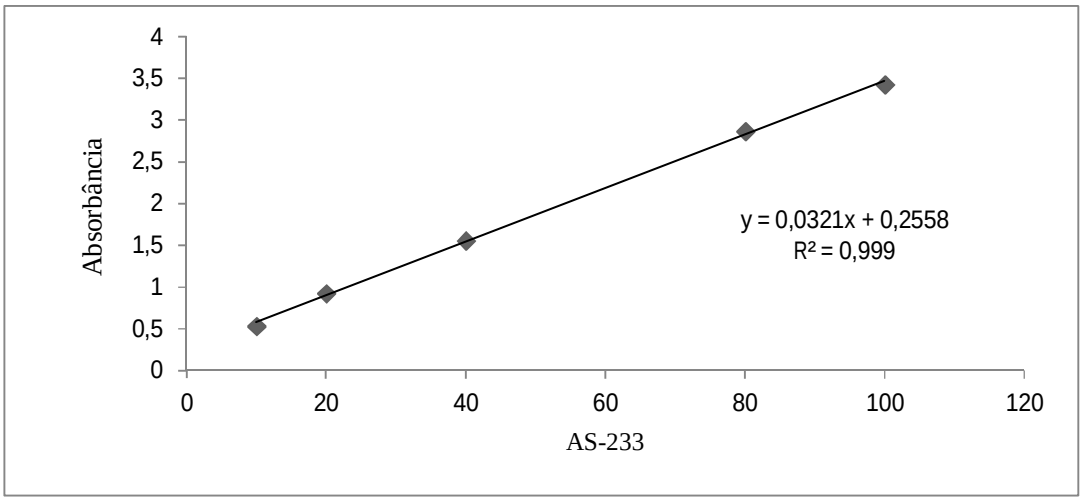
Sim	Não	Alergênicos	Descrição dos componentes
	X	trigo	
	X	outros cereais que contêm glúten	
	X	Crustáceos	
	X	Ovos	
	X	Peixe	
	X	Amendoim	
	X	Soja	
	X	Leite (incluindo lactose)	
	X	Nozes	
	X	Aipos	
	X	Mostarda	
	X	Sementes de gergelim	
	X	Dióxido de enxofre e sulfitos (>10 mg/kg)	
	X	Tremoço	
	X	Moluscos	

Legislação local referente a requisitos legais de rotulagem de alergênicos deve ser sempre consultada já que pode haver variações com dependendo do país.

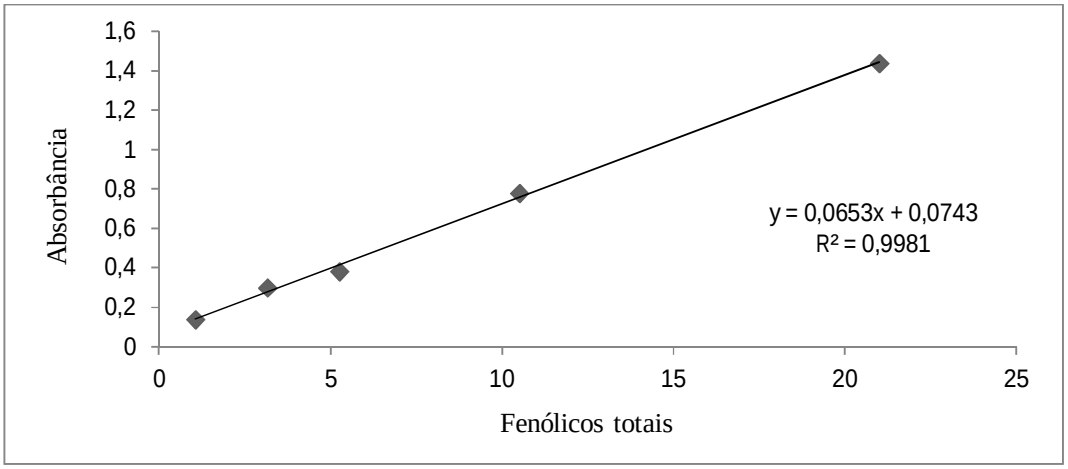
As informações contidas nesta publicação baseiam-se em nosso próprio trabalho de pesquisa e de desenvolvimento e são de nossa total confiança. Entretanto, os usuários devem realizar seus próprios testes para determinar a adequação de nossos produtos a seus fins específicos e as situações jurídicas de uso do produto. As declarações aqui contidas não devem ser consideradas como garantia de qualquer tipo, expressa ou implícita, e não assumimos nenhuma responsabilidade legal pela infração de qualquer patente.



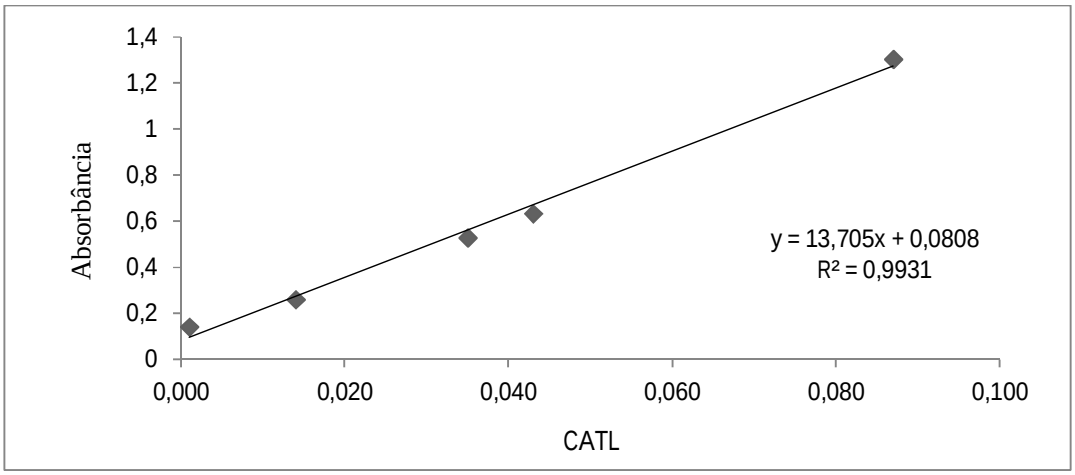
Curva de calibração (n = 3) de 7-cetocolesterol (µg 7-cetocolesterol/ mL)



Curva de calibração (n=3) das substâncias absorvidas a 233 nm (AS-233) (equivalente em µg 7-cetocolesterol/ mL)



Curva de calibração (n=3) de fenólicos totais (mg de ácido gálico/ 100mL)



Curva de calibração da CATL (n = 5) (equivalentes em mg de α- tocoferol/mL)