

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS
ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS, APLICAÇÃO EM
LINGUIÇA TOSCANA E AVALIAÇÃO DA SUA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vanessa Bordin Viera

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS ASSISTIDA POR
MICRO-ONDAS, APLICAÇÃO EM LINGUIÇA TOSCANA E
AVALIAÇÃO DA SUA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

Vanessa Bordin Viera

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Hashime Kubota

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS ASSISTIDA POR MICRO-
ONDAS, APLICAÇÃO EM LINGUIÇA TOSCANA E AVALIAÇÃO DA
SUA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

elaborada por
Vanessa Bordin Viera

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ernesto Hashime Kubota, Dr.
(Presidente/Orientador)

Rogério Manoel Lemes de Campos, PhD. (UNIVASF)

Juliano Smanioto Barin, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 15 de fevereiro de 2012.

Dedico esta dissertação aos meus pais Cedinei Antonio Viera e Maria de Lourdes Bordin Viera, exemplos de vida que sempre me estimularam a dar este grande passo. Com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por serem meus pais fonte de inspiração, apoio e ensino diário.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À **minha família**, aos meus pais **Cedinei Viera** e **Lourdes Viera** que me deram não somente a vida, mas principalmente a minha educação e condições de estudo. À minha irmã **Géssica**, que personifica a vontade de vencer, a competência, a responsabilidade, o meu agradecimento pela paciência nas horas de mau humor quando tudo parecia dar errado: computador travar, inspiração faltar e tantas outras coisas que dividimos nesses últimos dois anos. À minha irmã **Andréia Viera** por sua extensa paciência, que apesar da distancia (aproximadamente 2.090 Km) está sempre disposta a me ajudar em qualquer situação e principalmente pelo apoio que me conforta e me deixa mais forte para superar meus desafios. Especialmente ao meu sobrinho **Sergio Luis** um presente divino em minha existência. Obrigada por vocês existirem, por depositar em mim a confiança para todas as horas, por compreender minha ausência. Amo vocês eternamente.

Meus agradecimentos ao meu orientador, professor **Dr. Ernesto Hashime Kubota**, que sempre demonstrou acreditar no meu potencial, pela oportunidade oferecida, pela orientação, pelo enriquecimento dos meus conhecimentos com suas argumentações científicas, por me mostrar o caminho da ciência e principalmente pelo bom convívio nestes dois anos de trabalho. Orientador é uma palavra ideal para defini-lo: é sob sua tutela que guio meus passos. Muito obrigado!

À professora **Dra. Claudia Severo da Rosa**, os meus maiores e sinceros agradecimentos. Sua confiança e orientação foram capazes de me fazer trilhar por um crescimento profissional. Toda minha admiração por seu brilhantismo acadêmico se torna secundária quando contemplo seu lado humanista.

À minha querida colega de mestrado e amiga **Natiéli Piovesan** aqui meus agradecimentos pelas confabulações, pela escuta sempre afinada, receptiva e acolhedora, pelas inúmeras discussões e reflexões que sempre transbordaram o universo acadêmico migrando para o universo da vida, pelas caronas, por “abraçar” este trabalho mesmo que para isso fosse necessário acordar às quatro horas da madrugada para execução das análises, pelos almoços e cafés regados a muitas risadas, principalmente pela relação de confiança que se desenvolveu ao longo desses dois anos. Por estar presente nos momentos difíceis da minha

vida, assim como compartilhar momentos de vitória como nossa aprovação no doutorado. Com sua amizade e parceria afirmo que nada na vida conquistamos sozinhos. Sempre precisamos de outras pessoas para alcançar os nossos objetivos. Muitas vezes um simples gesto pode mudar a nossa vida e contribuir para o nosso sucesso. Muito obrigada amiga! Sem você esse trabalho não teria acontecido.

Aos professores **Dr. Roger Wagner, Dr. Juliano Barin e Dra. Claudia Sauter** pelas valiosas conversas e sugestões essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus **amigos e colegas de mestrado** por ter dividido da amizade, alegrias, frustrações, conquistas, discussões. Agradeço a todos pelos conselhos dados, que de forma direta ou indireta, contribuíram na execução desta dissertação.

Agradeço às alunas estagiárias do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos em especial a estagiária **Fernanda Ludtke, Felipe e Gabriela Scapin** pela amizade autêntica, pela ajuda, pelo estímulo e por acreditar sempre.

Aos funcionários **Lia, Moisés, Aline, Carlos, Marta** em especial a **Liana, Ana, Marialene (Madre) e ao Magé (Pereirinha)**, pela dedicação, auxílio nas análises e pelos almoços no departamento. É prazeroso, todos os dias, receber um “bom dia” de pessoas que realmente desejam a você um bom dia.

Às amigas **Suelen e Pauline** gostaria de registrar que é sempre muito acalentador saber que posso contar com um ombro amigo. A elas, que nos momentos de angústias e dificuldades, tiveram sempre uma palavra de incentivo, agradeço eternamente.

Ao **setor de Química Industrial e Ambiental do Departamento de Química Da Universidade Federal de Santa Maria – RS** pelo empréstimo do micro-ondas focalizada para realização deste trabalho.

Ao **CNPQ** pela bolsa de mestrado para que fosse possível a execução deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS, APLICAÇÃO EM LINGUIÇA TOSCANA E AVALIAÇÃO DA SUA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

AUTORA: VANESSA BORDIN VIERA

ORIENTADOR: ERNESTO HASHIME KUBOTA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 15 de fevereiro de 2012.

O presente estudo teve por objetivo avaliar o extrato etanólico de própolis obtida por extração assistida por micro-ondas focalizada quanto ao teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e sua aplicação em linguiça toscana. Nos extratos de própolis obtido foram quantificados o conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método de DPPH. Após os extratos serem comparados, o que obteve melhor resultado foi utilizado, nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% (p/v) na fabricação de linguiça toscana sendo posteriormente analisadas sob armazenamento refrigerado a 4°C durante 56 dias. Foram realizadas análises de umidade, proteínas, cinzas, e gordura. As linguiças foram analisadas a cada sete dias em relação ao pH, cor, índice de TBARS e análises microbiológicas. A análise sensorial foi avaliada através do teste de aceitabilidade com Escala Hedônica de nove pontos e calculado índice de aceitabilidade. Os resultados obtidos na composição centesimal dos produtos estão de acordo com o exigido pela legislação brasileira. Com relação a cor do produto, este apresentou uma coloração com uma tonalidade mais amarelada ou seja, mais clara. No período final de estocagem o valor de TBARS para linguiça com 2,0% de extrato foi de $0,249 \pm 0,021$ MDA/Kg de amostra e a controle de $1,641 \pm 0,037$. Os valores para *Staphylococcus* coagulase positiva; *Samonella*; Coliformes totais e Coliformes fecais foram inferiores aos limites estabelecidos pela legislação. Os índices de aceitabilidade (IA%) para os atributos sabor e odor do produto com maior concentração de própolis foi insatisfatório, sendo abaixo de 70%. Já nas concentrações de 0,5% e 1,0% os índices de aceitabilidade para os atributos cor, odor, sabor, textura e aparência global foram satisfatórios, sendo acima de 70%. Conclui-se que a extração através do micro-ondas é eficiente e que a adição de 0,5%, 1,0% e 2,0% de extrato de própolis pode ser utilizada na elaboração de linguiça toscana visando prolongar a vida de prateleira frente a oxidação lipídica.

Palavras-chave: propólis, oxidação, antioxidante natural, microondas, compostos fenólicos.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

OBTAINING PROPOLIS MICROWAVE ASSISTED EXTRACT, USING IN TUSCANY ITALIAN SAUSAGE AND EVALUATING ITS ANTIOXIDANT CAPACITY

AUTHOR: VANESSA BORDIN VIERA

ADVISOR: ERNESTO HASHIME KUBOTA

Date and Defense place: Santa Maria, February 15th, 2012.

The present study aimed to evaluate the propolis ethanolic extract obtained by microwave assisted extraction regarding to its phenolic compounds amount, antioxidant activity and its use in the Tuscany Italian sausage. The amount of total phenolic content and antioxidant activity was evaluated by the DPPH method. After optimization, the selected extraction parameters were used to obtain extracts used in 0, 5%, 1% and 2% (p/v) concentrations in the Tuscan Italian sausage manufacture, which were analyzed during 56 days. It was analyzed humidity, protein, ash and fat. The sausages were analyzed every seven days for pH, color, TBARS index and microbiological analyses. The sensory analysis was evaluated through the acceptability test with 9 points in the Hedonic Scale and the acceptability index was calculated. The results obtained for centesimal composition are in accordance to the Brazilian law. Regarding color, the product presented a yellowish color, that is, a lighter one. In the final storage period the TBARS value for the sausage with 2% extract was $0,249 \pm 0,021$ and the control one was $1,641 \pm 0,037$ MDA/Kg de amostra. The values for *Staphylococcus* positive coagulase; *Salmonella*; Total Coliforms and fecal Coliforms were lower than the values limited by law. The acceptability index (IA %) for taste and smell of the products with the highest concentration of propolis was not satisfactory, being lower than 70%. For 0,5% and 1% concentrations the acceptability indexes for color, smell, taste, texture and general appearance were satisfactory, higher than 70%. It is possible to conclude that the extraction with microwaves is efficient and the addition of 0,5%, 1% and 2% propolis extract can be used in the Tuscan Italian sausage manufacture to make its shelf life longer facing the lipid oxidation.

Key-words: propolis; oxidation; natural antioxidant; microwave; phenolic compounds.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Própolis bruta utilizada para obtenção do extrato.....	25
Figura 2 - Forno de microondas focalizadas, CEM, Star System 2, equipado com frasco de vidro utilizado para obtenção do extrato de própolis.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características de Identidade e Qualidade de Lingüiças Frescas.....	19
Tabela 2 - Métodos de obtenção do extrato de própolis.....	28
Tabela 3 - Programa utilizado para a obtenção do extrato de própolis no forno de microondas com radiação focalizada.....	33
Tabela 4 - Formulação de lingüiça toscana.....	36
Tabela 5 - Valores médios de atividade antioxidante máxima, IC50 e Conteúdo de polifenóis totais para os extratos de própolis obtida a 70°C utilizando forno de microondas focalizadas e método de agitação.....	44
Tabela 6 - Composição centesimal da lingüiça toscana durante o período de armazenamento a 4°C.....	46
Tabela 7 - Valores médios de pH do produto durante o período de armazenamento a 4°C.....	49
Tabela 8 - Valores médios de TBARS das amostras de lingüiça toscana durante o período de armazenamento a 4°C.....	50
Tabela 9 - Valores médios para a Luminosidade (L*), cor vermelha (a*), cor amarela (b*), saturação (C*), ângulo de tonalidade (h*) e a diferença global (ΔE^*) da lingüiça toscana durante o período de armazenamento a 4°C.....	52
Tabela 10 - Valores médios da contagem de aeróbios mesófilos totais, psicotróficos, <i>Staphylococcus coagulase negativa e positiva</i> , Coliformes Totais a 35°C, Coliformes a 45°C. <i>Salmonella</i> e <i>Clostridium sulfito redutor</i> em amostras de lingüiça toscana durante o período de armazenamento a 4°C.....	56
Tabela 11 - Médias das notas e Índice de Aceitabilidade atribuídas para as lingüiças toscana.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a* - Variação entre a cor vermelha (+a*) e a verde (-a*)
ANOVA – Análise de variância
B* - Variação entre a cor amarela (+b*) e o azul (-b*)
BHA – Butil-hidroxi-anisol
BHI – Infusão Cérebro Coração
BHT – Butil hidróxi-tolueno
BREMIL – Indústria de Produtos Alimentícios
C* - Saturação
CAMNPAL – Cooperativa Agrícola Mista Nova Palma LTDA
CISPOA – Cordenadoria de Inspeção de Produtos de Origem Animal
DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EAG – Equivalente Ácido Gálico
EEP – Extrato Etanólico de Própolis
H* - Ângulo de tonalidade
IA – Índice de Aceitabilidade
IC₅₀ – Concentração Inibitória
Log – Logaritmo
L* - Luminosidade, variando de 0 (preto) até 100 (branco)
MDA – Malonaldeído
NMP – Número Mais Provável
pH – Potencial hidrogeniônico
PG – Propil Galato
TBA – Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS – Substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico
TBHQ – Tércio butilhidroxiquinona
THBP – Tri-hidroxi-butilfenona
UFC – Unidade Formadora de Colônias
VRBA – Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bille
ΔE – diferença global

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Fotos referentes ao 56º dia de armazenamento das lingüiças toscana..... 79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Lingüiça frescal	19
3.2 Oxidação lipídica	20
3.3 Antioxidantes	21
3.3.1 Antioxidantes sintéticos.....	22
3.3.2 Antioxidantes naturais.....	23
3.3.2.1. Própolis.....	24
3.4 Métodos de extração	27
3.4.1 Extração assistida por microondas focalizada.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Matéria-prima	32
4.2 Métodos	32
4.2.1 Obtenção do extrato de própolis.....	32
4.2.1.1 Extração assistida por microondas focalizada.....	33
4.2.1.2 Extração por agitação.....	34
4.2.2 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos.....	34
4.2.3 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	35
4.2.4 Elaboração do produto.....	35
4.2.5 Composição centesimal.....	37
4.2.6 Determinação do pH.....	37
4.2.7 Determinação da cor.....	37
4.2.8. Avaliação da oxidação lipídica.....	38
4.2.9 Análises microbiológicas.....	38
4.2.9.1 Contagem de Coliformes a 35°C.....	38
4.2.9.2 Contagem de Coliformes a 45°C.....	39
4.2.9.3 Contagem de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva e negativa.....	39
4.2.9.4 <i>Salmonella SP</i>	39
4.2.9.5 <i>Clostridium sulfito redutor</i>	40
4.2.9.6 Microorganismos mesófilos.....	40
4.2.9.7 Microorganismos psicotróficos.....	40
4.2.10 Análise sensorial.....	41
4.2.11 Análise estatística.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Obtenção do extrato de própolis	43
5.1.2 Compostos fenólicos totais e Capacidade Antioxidante do extrato de própolis.....	43
5.2 Caracterização do produto	46
5.2.1 Composição centesimal.....	46
5.2.2 pH.....	47
5.2.3 Oxidação lipídica.....	50
5.2.4 cor.....	52
5.2.5 Estabilidade microbiológica.....	56
5.2.6 Análise sensorial.....	61

6 CONCLUSÃO.....	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

Entende-se por Lingüiça o produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionados ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, e submetido ao processo tecnológico adequado. Lingüiça designada Toscana é o produto cru obtido exclusivamente de carnes suína, adicionada de gordura suína e ingredientes (BRASIL, 2000).

A lingüiça frescal é um produto cárneo com processamento relativamente simples e, empregando-se normas higiênico-sanitárias adequadas a produção pode ser bastante rentável. É um produto que devido ao alto teor de gordura, a natureza das matérias-primas e a falta de tratamento térmico, tornam-se propensa à deterioração por oxidação lipídica e contaminação microbiana (GEORGANTELIS et al., 2007).

Algumas estratégias são utilizadas para impedir a oxidação lipídica, dentre elas pode-se citar a utilização de embalagens a vácuo restringindo o acesso ao oxigênio durante o armazenamento e o uso de antioxidantes (TANG et al., 2001).

Os antioxidantes são adicionados a produtos frescos e em carnes processadas para prevenir o ranço oxidativo, retardar o desenvolvimento de *off-flavors* e melhorar a estabilidade de cor (NAM; AHN, 2003). Dentre os antioxidantes sintéticos pode-se citar o BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno), GP (galato de propila) e TBHQ (tercbutilhidroquinona) como os mais utilizados (RAMALHO; JORGE, 2006). O emprego destes compostos, entretanto, tem sido alvo de questionamentos, quanto à sua inocuidade, motivando a busca de antioxidantes naturais, que possam atuar isolados, ou sinergicamente, com outros aditivos, em substituição aos sintéticos (SOARES, 2002).

Extratos das plantas ricas em polifenóis são boas opções, pois eles são facilmente obtidos a partir de fontes naturais e podem prevenir a oxidação lipídica em produtos alimentícios (WARNER; NEFF; ELLER, 2003).

Entre os extratos naturais, a própolis tem se destacado, tanto pelas suas diversas propriedades biológicas (CHEN et al., 2003; HAYACIBARA et al., 2005; OLDONI, 2007), quanto pela sua aplicabilidade nas indústrias de cosméticos e alimentos, utilizada como ingrediente na formulação de diversos produtos (MATSUDA, 1994). Os compostos fenólicos juntamente com os flavonóides participam na atividade antioxidante (CASTRO et al., 2007; SILVA et al., 2006).

A extração de substâncias pode ser realizada de diferentes maneiras, a qual envolve normalmente, uma extração simples, quando a amostra é deixada em contato com o solvente a frio por um tempo determinado, com ou sem agitação, ou por uma extração exaustiva, que utiliza um aparelho com solvente aquecido, passando continuamente através da amostra (JEFFERY et al., 1992).

A maneira mais comum para se extrair os princípios ativos da própolis bruta é por extração simples, conhecida como maceração. Geralmente, uma solução 30% da amostra é deixada em contato com álcool etílico P.A ou 70% (v/v). O tempo de contato da própolis bruta com o solvente pode variar de semanas a meses, com ou sem agitação, à temperatura ambiente (PEREIRA, 2008).

Diversos trabalhos descrevem procedimentos de extração utilizando diferentes solventes extratores, tempos e temperaturas de extração. Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004) utilizaram extrato etanólico obtido em temperatura ambiente por 24 horas. Park et al. (1995) e Koo e Park (1997) utilizaram para cada 2 gramas de própolis 25 ml de etanol 80%, utilizando agitação por 30 minutos e temperatura de 70°C. Ao contrário de Moreno et al. (2000) que para cada grama de amostra pulverizada utilizaram 15 ml de etanol 80% e agitação contínua por 24 horas a temperatura ambiente. Sforcin et al. (2000) trituraram 30 g de própolis com 100 ml de álcool etílico 95°, empregando agitação moderada e temperatura ambiente. A mesma metodologia foi utilizada por Bosio et al. (2000), Fernandes Jr et al. (2001), para a obtenção de extratos etanólicos de própolis de Meliponídeos, utilizaram 100 g de amostra para cada 100 ml de etanol 95%, em temperatura ambiente por dois dias. Miorin et al. (2003) utilizaram 100 g de amostra e 200 ml de etanol 95% em um banho com agitação por 1 semana a 25°C.

Diversas técnicas de extração são amplamente utilizadas para o isolamento de substâncias bioativas a partir de fontes naturais (SELF, 2005). No entanto, são técnicas geralmente demoradas e devem ser cuidadosamente controladas, pois são susceptíveis de causar degradação ou mudanças químicas indesejadas no produto. A extração assistida por micro-ondas é reconhecida como eficiente técnica de extração, pois permitem a redução do tempo de trabalho, aumento do rendimento e melhor qualidade do extrato (CRAVOTTO et al., 2008).

Atualmente os métodos de extração buscam redução do tempo de extração, utilização de baixas temperaturas, economia de solventes, aumento no rendimento, além de serem técnicas simples e rápidas. Neste contexto, este estudo utilizou o forno de micro-ondas com

radiação focalizada, visando avaliar os efeitos produzidos no processo de extração de compostos fenólicos da própolis e ampliação do conhecimento desta técnica ainda não utilizada para esta matéria-prima.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o extrato etanólico de própolis obtida por extração assistida por micro-ondas focalizada quanto ao teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e sua aplicação em linguiça toscana.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as condições de temperatura e tempo de extração, a fim de obter o melhor rendimento de extração de compostos fenólicos da própolis;
- Quantificar o conteúdo fenólico total e atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de própolis;
- Elaborar linguiça toscana utilizando diferentes níveis do extrato de própolis que apresentar as melhores características antioxidantes;
- Caracterizar as linguiças quanto a composição centesimal, pH, cor e análises microbiológicas;
- Avaliar o efeito do extrato de própolis em diferentes concentrações na estabilidade lipídica e microbiológicas das linguiças durante o armazenamento;
- Avaliar a aceitação sensorial das formulações do produto elaborado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Lingüiça Frescal

Entende-se por lingüiça o produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açogue, adicionados ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, e submetido ao processo tecnológico adequado. Lingüiça designada Toscana é o produto cru obtido exclusivamente de carnes suína, adicionada de gordura suína e ingredientes (BRASIL, 2000). Quanto às lingüiças frescas, são apresentadas ainda as seguintes características:

Tabela 1 – Características de Identidade e Qualidade de Lingüiças Frescas

Características	Unidade (%)	Quantidade
Umidade	máx.	70
Proteína	min.	12
Gordura	máx.	30
Amido	Não permitido	0
CMS	Não permitido	0
Proteína não carne	máx.	0
Cálcio (em base seca)	máx.	0,1

Fonte: BRASIL, 2000

As principais etapas envolvidas no processamento de lingüiça segundo Terra (1998) são:

- ✓ Recebimento da matéria-prima;
- ✓ Preparo e formulação;
- ✓ Moagem;
- ✓ Mistura das carnes com os condimentos e aditivos até completa homogeneização para o desenvolvimento do sabor e início do processo de cura;
- ✓ Embutimento.

Devido ao alto teor de gordura, a natureza das matérias-primas e a falta de tratamento térmico tal produto é propenso a oxidação lipídica e a contaminação microbiana (GEORGENTALIS et al., 2007).

3.2 Oxidação Lipídica

A oxidação dos constituintes lipídicos é uma reação importante que limita a vida de prateleira de vários alimentos, sendo um dos mecanismos primários da deterioração da qualidade em produtos alimentícios, especialmente de carnes. As alterações na qualidade podem ser percebidas pelas mudanças de sabor, cor, textura, valor nutricional e pela produção de compostos potencialmente tóxicos.

De acordo com Almeida (2005), os principais fatores que afetam a deterioração da qualidade da carne pela oxidação lipídica incluem a composição dos fosfolipídeos, o teor de ácidos graxos poliinsaturados na carne, a presença de íons metais livres. Dentre os fatores extrínsecos que contribuem para o desenvolvimento da oxidação lipídica em carnes estão as condições de processamento, como a moagem, o tratamento térmico, a aplicação de alta pressão, a adição de outros ingredientes a formulação do produto, a temperatura de armazenamento, o tipo de embalagem e a exposição à luz (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2009).

Existem basicamente dois tipos de rancidez que podem ser classificados como: 1) rancidez hidrolítica – ocorre na presença de umidade devido à ação das enzimas lípases que catalisam a reação de hidrólise dos acilgliceróis, liberando ácidos graxos, e 2) rancidez oxidativa ou oxidação – ocorre devido a ação de enzimas lipoxigenases ou mediante ação não-enzimática, tais como auto-oxidação e a foto-oxidação (COLTRO; BURATIN, 2004). A oxidação se constitui o mecanismo oxidativo mais relevante na deterioração de lipídeos da carne.

A oxidação lipídica em carnes pode ser acompanhada pela determinação dos valores de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico ou TBARS (substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico). A reação envolve o ácido 2-tiobarbitúrico com o malonaldeído produzindo um composto de cor vermelha, medido espectrofotometricamente a 532nm de comprimento de onda (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005).

A exigência dos consumidores e a preocupação constante de proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade levaram à adoção de medidas que permitem limitar o fenômeno de oxidação durante as fases de processamento e armazenagem dos produtos. Deste conjunto de ações, a adição de compostos antioxidantes é, sem dúvida, uma prática bastante eficiente, razão que justifica o atual interesse pela pesquisa de novos compostos com capacidade antioxidante. O baixo custo de obtenção, facilidade de emprego, eficácia, termo-resistência e ausência reconhecida de toxicidade, são premissas para a sua seleção e utilização a nível industrial (CASTERA-ROSSIGNOL; BOSQUE, 1994).

3.3 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias capazes de seqüestrar ou impedir a formação de radicais livres. O mecanismo de ação dos antioxidantes está bem elucidado, isto é, para que um composto seja eficiente na redução das reações da autooxidação é necessário que ele iniba a formação de radicais livres na iniciação da cadeia de oxidação ou interrompa a sua propagação (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Embora a inibição completa da oxidação lipídica até agora não tenha sido conseguida, o uso de antioxidantes tem conseguido retardar esse processo por períodos longos, de modo a permitir o consumo dos lipídios ou dos alimentos que os contém, mesmo após seu armazenamento por muitos meses (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

Para proteger os lipídios e evitar a deterioração sensorial e aparente, as indústrias alimentícias têm feito uso de vários aditivos alimentares com propriedades antioxidantes. Entretanto, a conscientização dos consumidores dos riscos à saúde provocados pelos aditivos, resultou em indicações às indústrias alimentícias para se evitar o uso de aditivos sintéticos, e desta forma estuda-se a possibilidade do uso de aditivos naturais ou métodos alternativos para extensão da vida-de-prateleira, aumentar a segurança e evitar os danos da oxidação lipídica (GEORGANTELIS et al., 2007).

3.3.1 Antioxidantes Sintéticos

Os compostos antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos, entre outros, são butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), Térci butilhidroxiquinona (TBHQ), trihidroxibutilfenona (THBP) e propilgalato (PG) (SOUSA et al., 2007). São compostos com estrutura fenólica que ao doar um próton a um radical livre regenera a molécula de acilglicerol e interrompe o mecanismo de oxidação, e os derivados fenólicos são assim transformados em radicais livres, os quais podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação (BUCK, 1981).

O BHA é um antioxidante mais efetivo na supressão da oxidação em gorduras animais que em óleos vegetais. É insolúvel em água e extremamente solúvel em gorduras, apresenta pouca estabilidade frente a elevadas temperaturas, mas é particularmente efetivo no controle de oxidação de ácidos graxos de cadeia curta (RAMALHO; JORGE, 2006). O butilhidroxitolueno (BHT) tem propriedades similares ao BHA ambos são sinergistas entre si. Os antioxidantes chamados sinérgicos são aqueles que quando misturados apresentam uma atividade mais acentuada do que a atividade dos antioxidantes individuais, atuando como removedores de oxigênio e complexantes. Agem na regeneração de radical fenoxil, doando hidrogênio e regenerando o antioxidante primário (ARAUJO, 2001).

Em relação ao Propilgalato (PG) (éster do 3,4,5 ácido triidroxibenzoico) possui ótima atividade como antioxidante para estabilizar alimentos fritos, massas assadas e biscoitos preparados com gorduras (BAILEY, 1996).

A butilhidroxiquinona (TBHQ) é um pó cristalino branco e brilhoso, moderadamente solúvel em óleos e gorduras e não se complexa com íons de cobre e ferro. O galato é considerado o melhor antioxidante para óleos de fritura, pois resiste ao calor e proporciona uma excelente estabilidade para os produtos acabados (RAMALHO; JORGE, 2006).

Embora potentes antioxidantes como BHA e BHT sejam permitidos em produtos cárneos, em quantidades de 0,01 gramas de antioxidante para cada cem gramas de produto (GRÜN et al., 2006), os antioxidantes sintéticos requerem testes extensos e de custo elevado para comprovar a sua segurança para aplicação em alimentos (MARTINEZ-VALVERDE; PERIAGO; PROVAN, 2002).

Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade de antioxidantes sintéticos apresentarem algum efeito tóxico e serem promotores de alguns tipos de câncer entre outros

efeitos fisiológicos (SOARES, 2002). Devido a esse fato a busca por substitutos naturais para os antioxidantes sintéticos tem elevado o número de pesquisas envolvendo os alimentos de origem vegetal, que são potenciais fontes destas substâncias como ácido ascórbico, tocoferol, carotenóides e uma ampla variedade de compostos fenólicos (MARTINEZ-VALVERDE; PERIAGO; PROVAN, 2002).

3.3.2 Antioxidantes Naturais

O uso de antioxidantes sintéticos para prolongar a vida de prateleira de carnes e produtos cárneos é comum na indústria de alimentos. No entanto, observa-se uma demanda cada vez maior de produtos naturais pelos consumidores, devido à crescente preocupação com a saúde. Assim, o uso de condimentos como antioxidantes naturais tem sido objeto de estudo em pesquisas que empregam diversas matrizes alimentares como hambúrgueres, almôndegas, embutidos, desidratados e cortes marinados (MARIUTTI et al., 2008).

O uso de conservantes naturais para aumentar a vida útil dos produtos de carne é uma tecnologia promissora uma vez que muitas substâncias vegetais possuem propriedades antioxidante e antimicrobiana. Os ingredientes funcionais em produtos cárneos podem melhorar as qualidades nutricionais e prolongar a vida de prateleira (FERNÁNDEZ-GINÉS et al., 2005).

Atualmente diversos estudos têm sido realizados visando verificar o potencial antioxidante dos ácidos fenólicos, com o objetivo de substituir os antioxidantes sintéticos. A utilização de antioxidantes naturais tem abrangido toda a cadeia de produção de carnes, não se restringindo apenas nos produtos finais. Diante deste fato uma diversidade de antioxidantes naturais têm sido estudados para tal fim. (DURAN; PADILLA, 1993; PEREIRA, 2009).

Extratos das plantas ricas em polifenóis são boas opções, pois eles são facilmente obtidos a partir de fontes naturais e que auxiliam contra a oxidação lipídica em produtos alimentícios. Entre os antioxidantes naturais mais utilizados podem ser citados tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas como alecrim e sálvia (WARNER; NEFF; ELLER, 2003). Em estudo realizado por Ahn, Grun e Fernando (2002) o extrato de semente de uva foi avaliada pelo seu efeito antioxidante em alguns tipos de carne e tem sido relatados para melhorar a estabilidade oxidativa da carne cozida, hambúrgueres de peru e carne de peru

armazenado refrigerado.

Em estudo realizado por Terra et al. (2000) foi verificado os efeitos antioxidantes e antimicrobianos do extrato de chá preto (*Camellia sinensis*) e extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Milani et al. (2001) analisou os efeitos antioxidantes dos extratos alcoólico e metanólico de chá verde, chá preto (*Camellia sinensis*) e de erva mate (*Ilex paraguariensis*).

A proposta de verificar o efeito antioxidante também pode ser verificada em estudos com extratos hidro-alcoólico e metílico da casca de maçã e folhas de alcachofra e do extrato metílico de erva mate (MILANI et al., 2002), extrato bruto de caqui versus extrato de alecrim em diferentes concentrações (HOFFMANN, 2003) aplicados em carne mecanicamente separada de frango (CMSF). Constatou-se também que a aplicação dos extratos hidro-etanólicos de marcela (*Achyrocline satureioides*) e de erva mate (*Ilex paraguariensis*) em linguiça apresentaram um efeito positivo no retardo da oxidação lipídica em linguiça, sendo que o extrato hidro-etanólico de marcela apresentou ação superior (FURTADO et al., 2004).

Entre os extratos naturais, a própolis tem se destacado, tanto pelas suas diversas propriedades biológicas (CHEN et al., 2003; HAYACIBARA et al., 2005; OLDONI, 2007), quanto pela sua aplicabilidade nas indústrias de cosméticos e alimentos, utilizada como ingrediente na formulação de diversos produtos (MATSUDA, 1994).

3.3.2.1 Própolis

Etimologicamente, a palavra própolis, de origem grega, significa: pró = em defesa, e polis = cidade, evidenciando a sua importância para a colônia que a utiliza para vedar frestas, recobrir superfícies irregulares ou insetos e eventuais invasores que morrem no interior da colméia, com a finalidade de evitar sua decomposição. A própolis (Figura 1) é um material resinoso, encontrado em tons que variam do amarelo-esverdeado, passando pelo marrom-avermelhado ao negro (BANSKOTA et al., 2000).



Figura 1 – Própolis bruta utilizada para obtenção do extrato. Fotos: Acervo pessoal do autor (2011)

Própolis é uma denominação genérica utilizada para descrever uma mistura complexa de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas colhidas por abelhas melíferas de brotos, flores e exsudatos de plantas, às quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto final. Seu emprego na colméia está relacionado com suas propriedades mecânicas, sendo utilizada na construção, adaptação e proteção da colméia, e sua atividade antimicrobiana garante um ambiente asséptico (FUNARI; FERRO, 2006). A própolis apresenta aroma forte e característico, em consequência de uma fração volátil de ácidos fenólicos, forte propriedade adesiva e um conjunto complexo de substâncias (55% de resinas e bálsamos; 30% de ceras; 10% de óleos voláteis e cerca de 5% de pólen) (BURDOCK, 1998; BANSKOTA et al., 2000).

A composição química da própolis é extremamente complexa e mais de 180 compostos foram identificados, destacando-se como de grande importância os flavonóides. Estes compostos fenólicos compreendem um amplo grupo de substâncias naturais não sintetizadas pelos animais (DAUGSCH et al., 2007). Cerca de 4.000 substâncias diferentes já foram listadas como flavonóides, tais como elaspigenina, quercetina, hesperetina, rutina, luteolina, genisteina, daidzeina, antocianidina e canferol. A presença e a concentração destes compostos são utilizadas como índice de qualificação de amostras de própolis (AWALE et al., 2008).

Diversos estudos atribuem a atividade antioxidante da própolis aos flavonóides, como quercetina, flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas, catequinas e isocatequinas. (CASTRO et al., 2007; SILVA et al., 2006). Estudos também sugerem que a maioria das

atividades biológicas e farmacológicas da própolis ocorre pela presença de um grande número de flavonóides, ácidos aromáticos e compostos fenólicos (MOHAMADZADEH et al., 2007), além de que a composição química da própolis distingue-se de região para região, e que a proporção dos tipos de substâncias encontradas são variáveis e dependentes do local de coleta, influenciando no tipo de ação farmacológica e toxicológica de uma amostra (MORENO et al., 2000; BANSKOTA et al., 2000).

Mendes da Silva et al. (2006) encontraram uma alta correlação entre a atividade antioxidante e níveis de fenólicos, indicando que os flavonóides desempenham um papel importante na atividade antioxidante de extratos de própolis. Essa mesma correlação foi verificada por Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004) analisando própolis de diferentes regiões geográficas e Isla et al. (2001) investigando a atividade antioxidante da própolis da Argentina, porém estes acreditam ter outros fatores envolvidos.

As análises de Kumazawa, Hamasaka e Nakayama, (2004), através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), constataram a presença de polifenóis e flavonóides em extrato etanólico de própolis (EEP) oriundas da Argentina, Austrália, Brasil, Bulgária, Chile, China, Hungria, Nova Zelândia, África do Sul, Tailândia, Ucrânia, Uruguai, Estados Unidos e Uzbequistão. Os resultados revelaram que os menores valores de polifenóis e flavonóides foram encontrados nas amostras da Tailândia (31,2 mg/g) e que os valores de polifenóis da própolis brasileira (120 mg/g) foram menores em relação à búlgara (220 mg/g) e chinesa (299mg/g), esses valores diferentes justificam-se pela diversidade da flora ecológica de cada região onde foi realizada a coleta.

A proposição de Kosalec et al. (2005) foi avaliar a quantidade de flavonóides em dez marcas comerciais de soluções etanólicas de própolis provenientes da Croácia, cujas concentrações variaram entre 7 a 25%, segundo informação dos fabricantes. Através de dois métodos colorimétricos, verificaram a presença de flavonas, flavonóis e flavanonas nas seguintes proporções: 0,14 a 0,41%, 0,43 a 18,78% e 6,45 a 10,0%, respectivamente. Devido à variação encontrada, os autores afirmaram que a qualidade comercial dessas requereria maior verificação e que esses valores poderiam ser resultado da amostras provenientes de regiões diferentes do país.

Os flavonóides, juntamente com ácidos fenólicos e ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas são considerados os mais importantes compostos antimicrobianos da própolis. Outros compostos são óleos voláteis e ácidos aromáticos (5 a 10%), ceras (30-40%), resinas, bálsamo e pólen que é uma rica fonte de elementos essenciais como magnésio, níquel, cálcio, ferro e

zinco (ALENCAR et al., 2007). O mecanismo de atividade antibacteriana é considerado complexo e pode ser atribuído ao sinergismo entre flavonóides, hidroxiácidos e terpenos (FERNANDES JÚNIOR et al., 2006).

Certamente a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos desta resina é uma das atividades farmacológicas mais popularmente conhecidas e comprovadas cientificamente (SALOMÃO et al., 2007). Diversos pesquisadores têm demonstrado tal atividade frente a microrganismo como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhinurium*, *Salmonella enteritidis*, entre outras (PARK et al., 1998). Ensaio *in vitro* utilizando 10 espécies bacterianas Gram-positivas e 20 Gram-negativas, constataram que a atividade antibacteriana da própolis demonstra ser mais eficaz dentre as Gram-positivas (SFORCIN et al., 2000; FERNANDES JÚNIOR et al., 2006; SALOMÃO et al., 2007; ARAÚJO, 2009).

Alguns trabalhos evidenciaram a capacidade da própolis de inibir o crescimento de *Helicobacter pylori* sendo este produto um potencial inibidor de úlceras gástricas (BANSKOTA; EZUKA; ADNYANA, 2001; BOYANOVA et al., 2005; MENEZES, 2005).

A própolis tem se destacado, tanto pelas suas diversas propriedades biológicas (CHEN et al., 2003; HAYACIBARA et al., 2005; OLDONI, 2007), quanto pela sua aplicabilidade nas indústrias de cosméticos e alimentos, utilizada como ingrediente na formulação de diversos produtos (MATSUDA, 1994).

Han e Park (2002) comprovaram o efeito do extrato de própolis na diminuição acentuada de TBARS em amostras de embutidos curados de carne suína quando comparado com amostras controle e amostras tratadas com sorbato. Segundo Figueiredo (2006) o extrato de própolis possuem cheiro característico que podem limitar o seu uso, porém se os níveis adicionados forem adequados os mesmos podem apresentar atividade antioxidante sem afetar o odor do alimento.

3.4 Métodos de Extração

Como descrito anteriormente, a composição da própolis é variável qualitativa e quantitativamente dependendo da ecoflora de cada região. Além disso, fatores associados à técnica de extração, metodologia de condução de ensaios e época do ano em que foi

produzida podem ter influência sobre o maior ou menor grau de atividade biológica (BIANCHINI; BEBENDO, 1998).

Existem outros aspectos que podem contribuir na variação química da própolis: o tipo e tempo de extração (quente, frio ou com diferentes fontes de aquecimento) ou mesmo o tipo de solvente com a qual a própolis é extraída (PARK et al., 1998). Diversos autores comprovam que ao se modificar o tipo de extração, tempo ou mesmo o solvente os componentes químicos da própolis variam também (TRUSHEVA; TRUNKOVA; BANKOVA, 2007).

Diversas técnicas de extração são amplamente utilizadas para o isolamento de substâncias bioativas a partir de substâncias naturais (SELF, 2005). No entanto, são técnicas geralmente demoradas e devem ser cuidadosamente controladas, pois são susceptíveis a causar degradação ou mudanças químicas indesejadas no produto (CRAVOTTO et al., 2008). Na Tabela 2 estão compilados alguns métodos para obtenção do extrato de própolis utilizados pela comunidade científica.

Tabela 2 – Métodos de obtenção do extrato de própolis.

Método	Temp (°C)	Tempo	Autor	Ano
Agitação	25	7 dias	Menezes et al.	1997
Agitação	70	30min	Park et al.	1998
Agitação	Ambiente	7 dias	Bosio et al.	2000
Agitação constante	Ambiente	24 horas	Moreno et al.	2000
Maceração	Ambiente	2 dias	Fernades et al.	2001
Soxhlet	Ebulição	8 horas	Marcucci et al.	2001
Agitação constante	70	30 minutos	Alencar	2002
Ultrassom	Ambiente	30 minutos	Kartal; Kaya; Kurucu	2002
Agitação	25	7 dias	Miorin	2003
Maceração	Ambiente	24 horas	Kumazawa, Hamasaka, Nakayama	2004
Agitação constante	60	30 minutos	Castro et al.	2007
Agitação constante	70	30 minutos	Cabral	2008

Maceração	Ambiente	20 horas	Andrade et al.	2009
Maceração	Ambiente	Não relata	Kumar et al.	2010

Silva et al. (2006), verificaram que houve variação na quantidade de flavonóides obtido por quatro diferentes métodos de extração de própolis, sendo os métodos de extração a frio mais eficientes que os métodos a quente. Extratos hidroalcoólicos nas concentrações de 10 a 20% de própolis verde obtidos a partir da extração em banho-maria a 70°C não apresentaram inibição frente a *Staphylococcus aureus*, enquanto extratos nas concentrações de 60 a 80% demonstraram inibição (PARK et al., 1998). Funari e Ferro (2006) realizaram extração da própolis utilizando o aparelho soxhlet e encontrou valores de cera dentro dos parâmetros exigidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Segundo Trusheva, Trunkova e Bankova, (2007) entre três métodos de extração testados para a própolis (ultra-som por 10 e 30 minutos, maceração por 72 horas e extração em micro-ondas por 20 e 30 segundos) com diferentes volumes de etanol a 70%, verificou-se que a quantidade de solvente usado não influencia no rendimento do extrato, sendo que, os três métodos de extração diferem principalmente em relação ao total de porcentagem de fenóis extraídos. No caso da extração em ultra-som, o rendimento de constituintes biológicos ativos como fenólicos e flavonóides aumentou com o tempo de extração realizada.

3.4.1 Extração assistida por micro-ondas focalizada

Além de métodos tradicionais de extração com solvente, a extração assistida por microondas tem sido relatada por melhorar a eficiência de extração de compostos traços em alimentos e solos. A extração com solvente utilizando o forno microondas pode ser realizada em sistema fechado (sob pressão controlada) ou aberto (sob pressão atmosférica) (CAMEL, 2000; ESKILSSON; BJORKLUND, 2000; KORNILOVA; ROSELL-MELE, 2003). O sistema aberto é conhecido como extração assistida por micro-ondas focalizada onde a amostra é aquecida de forma homogênea utilizando as micro-ondas focalizadas do sistema (CAMEL, 2000). Durante a extração assistida por micro-ondas focalizada, a radiação eletromagnética é aplicada diretamente na mistura solvente-amostra e é convertida em calor.

As moléculas alvos migram da matriz para o solvente devido ao aquecimento muito localizado. A absorção de energia das micro-ondas depende da natureza do solvente e da matriz da amostra. Na maioria dos casos, o solvente selecionado para extração, tais como metanol ou isopropanol, possuem uma alta constante dielétrica e absorvem fortemente energia de micro-ondas. No entanto, na extração de compostos termolábeis, a temperatura de extração é particularmente controlada para evitar a degradação dos componentes envolvidos (OUFNAC et al., 2007).

O forno de micro-ondas focalizadas (Figura 2) caracteriza-se por incidir uniformemente, mas não de maneira contínua as microondas e por possuir um dispositivo que mede a temperatura no interior do mesmo. Pelo painel de controle, localizado na parte externa do forno, é possível programar e monitorar a temperatura e o tempo desejados para cada processo (MATSUI, 2006). Possui um magnetron que propaga as ondas ali geradas por meio de um guia de ondas até a cavidade. A quantidade de energia das micro-ondas incidentes é controlada pela abertura de fendas posicionadas em cada cavidade. A potência e o tempo de abertura de cada fenda são estabelecidos pela temperatura selecionada na programação do equipamento. Sensores de infravermelho posicionados abaixo de cada frasco reacional possibilitam o controle de temperatura (OUFNAC et al., 2007).



Figura 2 – Forno de micro-ondas focalizadas, CEM, Star System 2, equipado com frasco de vidro utilizado para obtenção do extrato de própolis – Departamento de Química da UFSM. Foto: Acervo pessoal do autor (2011).

A extração assistida por micro-ondas é reconhecida como eficiente técnica de extração, reduzindo o tempo de trabalho, aumento do rendimento e melhor qualidade do extrato (CRAVOTTO et al., 2008). Em comparação com o tempo de extração por Soxhlet no qual normalmente necessita-se de poucas horas, o forno de micro-ondas precisa de poucos minutos. Comparando com a extração supercrítica, o micro-ondas é bem mais simples e barato (PARÉ; SIGOMIN; LAIPOINTE, 1991).

Kerem, German-Shashoua e Yarden (2005) compararam a eficiência de extração por Soxhlet e assistida por micro-ondas na remoção de saponinas de grão de bico e verificou-se que os perfis de extratos lipídicos obtidos após 20 minutos utilizando o processo por micro-ondas foram semelhantes aos observados após 3 horas de extração por Soxhlet.

Recentemente diversos estudos têm sido feito com a aplicação das micro-ondas para extração de compostos naturais, tais como: saponinas do ginseng (KWON; BÉLANGER; PARÉ, 2003), óleos essenciais (GOMEZ; WITTE, 2001) e antocianinas (SUN et al., 2008). No entanto, nenhuma informação ainda foi encontrada para aplicação da radiação micro-ondas na extração de compostos fenólicos da própolis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima

Para obtenção dos extratos as amostras de própolis bruta foram adquiridas na Natucentro Indústria e Apíários Centro Oeste Ltda, localizada na cidade de Bambuí (MG), transportadas em caixa de isopor via Sedex e armazenadas em freezer a -18°C até utilização.

A carne suína e os toucinhos utilizados foram adquiridos na Cooperativa Agrícola Mista Nova Palma Ltda (CAMNPAL), sob inspeção estadual CISPOA (Coordenadoria de Inspeção de Produtos de Origem Animal). Os ingredientes foram adquiridos em estabelecimentos comerciais da cidade de Santa Maria (RS), exceto o condimento para linguiça toscana, sal de cura e fixador que foram doados pela BREMIL Indústria de Produtos Alimentícios LTDA.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção do extrato de própolis

Para extração as amostras de própolis foram finamente moídas em moinho analítico refrigerado (4°C) (Quimis, modelo Q 298A21, Brasil) com auxílio de banho ultratermostatizado (Solab, modelo SL-152/10) e após esta etapa as amostras foram homogeneizadas.

As extrações assistidas por micro-ondas foram conduzidas nos Laboratórios do setor de Química Industrial e Ambiental do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria – RS e a extração por agitação no Laboratório do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria – RS.

4.2.1.1 Extração assistida por micro-ondas focalizada

Para extração assistida por micro-ondas focalizada utilizou-se de procedimentos descritos para digestão de amostras segundo Costa et al. (2006) com modificações. As extrações foram realizadas no forno de micro-ondas com radiação focalizada com duas cavidades equipado com frascos de vidro de capacidade máxima para 180 mL (Star System 2, 800 W, CEM, Matthews, N.C., EUA).

Inicialmente a própolis moída foi pesada (6g) e transferida para os frascos de vidro sendo adicionadas de solvente álcool de cereais 70% (60mL) (v/v) na proporção 1:10 (p/v) e submetidas à incidência das micro-ondas em diversas condições de tempo de rampa variando de 2,5 a 60min e temperatura na faixa de 70°C conforme apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Programa de aquecimento utilizado para a obtenção do extrato de própolis no forno de micro-ondas com radiação focalizada.

Tratamentos	Temperatura (°C)	Tempo de rampa (min)
A	70	2,5
B	70	5
C	70	10
D	70	20
E	70	30
F	70	45
G	70	60

Após o termino da extração, os extratos foram filtrados em papel filtro e centrifugados a 3000 rpm por 20 min. Posteriormente os sobrenadantes foram concentrados em rotaevaporador (Fisatom 802), acondicionados em frascos âmbar e armazenados em freezer (-18 °C) até o momento das análises.

No final de cada extração foi realizada a descontaminação do aparelho com 10 mL de álcool PA por um tempo de 10 minutos. Em seguida os frascos foram lavados com água Milli-Q e secos.

4.2.1.2 Extração por agitação

Para extração por agitação utilizou-se da metodologia descrita segundo Chaillou e Nazareno (2009) com modificações. O extrato de própolis foi preparado a partir da própolis previamente moída, pesada (6g) em um béquer e adicionada de álcool de cereais 70% (60mL) na proporção 1:10 (p/v). Em seguida esta mistura foi levada ao banho ultratermostatizado (Solab, modelo SL-152/10) e submetida agitação constante utilizando agitador (Marconi MA-039) por 30 minutos a uma temperatura de 70°C. Após os extratos foram filtrados em papel filtro e centrifugados a 3000 rpm por 20 min. Os sobrenadantes foram concentrados em rotaevaporador (Fisatom 802), acondicionados em frascos âmbar e armazenados em freezer (-18 °C) até o momento das análises.

4.2.2 Determinação dos compostos fenólicos totais

Para a determinação de fenólicos totais utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999) com modificações. Em um balão volumétrico o extrato foi diluído em álcool de cereais 70% na proporção 1:500 (v/v). Posteriormente uma alíquota (0,2 mL) da solução foi misturada a 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N (diluído 1:10). Posteriormente aguardou-se 6 minutos no escuro e adicionou-se 0,8 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7,5%. Após a incubação a temperatura ambiente (25°C) por 2 horas, a absorbância foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (SP-220 marca Biospectro). Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg EAG/L), calculados por meio de uma curva de calibração $Y = 0,018x + 0,2518$, onde Y é a absorbância e x é a concentração; $R^2 = 0,9999$, construída com concentrações que variam de 0 a 50 mg/g. As análises foram realizadas em triplicata e os valores são apresentados como a média (\pm desvio padrão).

4.2.3 Atividade antioxidante *in vitro*

A metodologia utilizada foi descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com adaptações. Esta fundamenta-se na capacidade de sequestro do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH). A técnica consistiu na incubação por 30 minutos, de 5 mL de uma solução etanólica (80% v/v) de DPPH 0,1 mM com 5 mL de soluções contendo concentrações crescentes de extrato hidroalcolico de própolis (0,07; 0,15; 0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5,0; 10; 20 e 30 mg/mL).

A solução “controle” consistiu de DPPH 0,1 mM em etanol 80% (v/v) e a solução “branco” de solvente etanol (80% v/v). Após incubação foram realizadas as leituras das amostras em espectrofotômetro (SP- 220 marca Biospectro) em comprimento de onda de 517nm. A porcentagem de atividade antioxidante (AA%) foi calculada através do percentual de captação do radical DPPH, conforme a Equação 1:

$$AA\% = 100 - \{[(Abs. amostra - Abs. branco) \times 100] \div Abs. controle\} \quad \text{Equação (1)}$$

Após a avaliação da faixa de concentração ideal, calculou-se a concentração necessária para capturar 50% do radical livre DPPH (IC₅₀) utilizando o programa GraphPad Prism 10.7.

4.2.4 Elaboração do produto

Para elaboração das lingüiças toscana levou-se em consideração os ingredientes e requisitos descrita pela Legislação (BRASIL, 2000), conforme Tabela 4 e procedimentos descritos por Terra (1998).

Tabela 4 – Formulação de linguiça toscana

Matéria-prima e Ingredientes	Quantidade (Kg)
Carne suína	85
Toucinho	15
Água/gelo	3
Sal	2,5
Condimento para linguiça toscana BREMIL	0,5*
Pimenta do reino branca em pó	0,1
Realçador de sabor	0,05
Alho	0,2
Cura BREMIL	0,25
Fixador BREMIL	0,25

*Conforme recomendação do fabricante

Inicialmente a carne suína e o toucinho foram moídos em moedor (Jamar PJ22, Jamar Ltda, São Paulo, Brasil). Na etapa seguinte a matéria-prima foi levada para misturadeira (Jamar MJI 35) adicionados os ingredientes e misturados até a obtenção da liga. Em seguida a massa foi dividida em quatro lotes de 5Kg, os quais foram adicionados das concentrações pré-definidas de extrato de própolis, originando os quatro tratamentos descritos a seguir:

Tratamento 1 Controle C (0%EP) – sem adição de extrato de própolis;

Tratamento 2 (0,5%EP) – linguiça toscana adicionada de 0,5% de extrato de própolis;

Tratamento 3 (1,0%EP) - linguiça toscana adicionada de 1% de extrato de própolis;

Tratamento 4 (2,0%EP) - linguiça toscana adicionada de 2% de extrato de própolis;

Após a mistura as massas foram embutidas em tripa suína que passaram por lavagem para remoção do sal e imersão em ácido láctico a 1% por 30 minutos para hidratação.

Para armazenamento as linguiças foram acondicionadas em bandejas de poliestireno, embaladas com papel filme, identificadas e imediatamente levadas a estufa D.B.O (ELETROLAB, Modelo EL 101) e conservadas à temperatura de + 4°C.

4.2.5 Composição centesimal do produto

Para determinação da composição centesimal as amostras de linguiças foram trituradas em multiprocessador até formação de uma pasta homogênea. Foram realizadas análises de umidade em estufa a 105°C, cinzas à 550°C e proteínas pelo método de Kjeldhal segundo metodologia descrita pela *Association Of Official Analytical Chemists* AOAC, (2005). A gordura foi realizada segundo Instituto Adolfo Lutz (IAL), (2008), pelo método do butirômetro.

4.2.6 Determinação do pH

A medida do pH foi realizada nos 0°, 7°, 14°, 21°, 28°, 35°, 42°, 49° e 56° dias de fabricação do produto. Homogeneizaram-se dez gramas de amostra com água destilada (1:10 p/v) no liquidificador. O homogeneizado foi submetido aos eletrodos do pHmetro Digimed, por cinco minutos, quando foi procedida a leitura em triplicata (TERRA; BRUM, 1988).

4.2.7 Determinação da cor

A determinação da cor foi realizada pelo aparelho Minolta Chroma Meter CR- 300, (MINOLTA), nos dias 0°, 7°, 14°, 21°, 28°, 35°, 42°, 49° e 56° de fabricação. A massa foi retirada da tripa e homogeneizada e em seguida distribuída em placas de petri. Os resultados foram expressos como L^* (que representa a porcentagem de luminosidade), a^* (onde $-a^*$ representa direção ao verde e $+a^*$ direção ao vermelho), b^* (onde $-b^*$ representa direção ao azul e $+b^*$ direção ao amarelo), C^* (índice de saturação) e h^* (ângulo de tonalidade). Para cada tratamento, foi obtido o valor médio de cinco leituras em diferentes pontos de três homogeneizados (replicatas). A diferença global (ΔE^*), foi obtida através da seguinte fórmula (HUNT et al., 1991):

$$\Delta E^* = [(L^* - L^*_{ref})^2 + (a^* - a^*_{ref})^2 + (b^* - b^*_{ref})^2]^{1/2} \quad \text{Equação (2)}$$

4.2.8 Avaliação da oxidação lipídica

A avaliação da oxidação lipídica das linguiças toscana foi conduzida pelo teste das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARs) segundo Raharjo et al. (1992), adaptado por Pereira (2009), onde pesou-se 10g de amostra previamente moída e homogeneizada em saqueta plástica, adicionou-se 40 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% e 1 mL do antioxidante sintético butilhidroxitolueno (BHT) 0,15%. Homogeneizou-se por um minuto em Stomacher, filtrou-se com auxílio de papel filtro qualitativo para balão volumétrico de 50 mL sendo o volume completado com a solução de ácido tricloroacético 5%. Deste balão, retirou-se uma alíquota de 5 mL e transferiu-se para tubo de ensaio, onde foi adicionado 5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,08M em ácido acético 50%. Os tubos foram incubados em banho-maria fervente por 40 minutos. A leitura foi realizada a 531 nm e os resultados comparados contra o branco. Os valores de TBARS foram determinados em triplicata para cada amostra após 0°, 7°, 14°, 21°, 28°, 35°, 42°, 49° e 56° dias de armazenamento e os resultados foram expressos em mg de malonaldeído por quilograma de amostra.

4.2.9 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas nos dias 0°, 7°, 14°, 21°, 28°, 35°, 42°, 49° e 56° de armazenamento do produto a +4°C.

4.2.9.1 Contagem de Coliformes a 35°C

O método utilizado para contagem de coliformes a 35°C (coliformes totais) foi o do número mais provável (NMP). Primeiramente, utilizado o método Agar Cristal Violeta

Vermelho neutro Bille (VRBA), com temperatura de incubação de 37°C pelo período de 48h e posterior contagem das colônias suspeitas (BRASIL, 2003).

4.2.9.2 Contagem de Coliformes a 45°C

Para a contagem de coliformes a 45°C (coliformes fecais) foram repicadas colônias de coliformes totais em caldo EC (*Escherichia coli*), incubando-se a $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$ pelo período de 48h, observando-se a produção de gás pelas colônias, a presença de gás nos tubos de Durham evidencia a fermentação da lactose presente no meio (BRASIL, 2003).

4.2.9.3 Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa

Determinou-se *Staphylococcus* coagulase negativa e positiva de acordo com Brasil (2003), utilizando-se Agar Baird-Parker. As diluições foram semeadas em placas e incubadas invertidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 30 a 48h. Foram realizadas as contagens de colônias típicas, de cor preta brilhante com anel branco opaco rodeado com halo claro transparente. Para confirmação do teste de coagulação do *Staphylococcus* coagulase positiva, três a cinco colônias típicas foram selecionadas e semeadas em caldo de infusão cérebro-coração (BHI), em plasma de coelho.

4.2.9.4 *Salmonella* sp

Apartir de 25 g da mostra realizou-se um pré-enriquecimento em caldo lactosado a 37°C durante 24h. Após, realizado um enriquecimento seletivo em caldo tetracionato verde brilhante e rappaports vassiliadis, levado a estufa por 24h a 42,5 °C. A partir destes, semeou se uma alíquota em placas com agar SS (*Salmonella Shiguella*) e ágar Rambach, incubado a 37°C por 24h, para confirmação final foi realizada a série bioquímica (BRASIL, 2003).

4.2.9.5 *Clostridium* sulfito redutor

Apartir de 25 g da mostra realizou-se a inoculação da amostra em meios de cultura seletivos. Após as placas foram incubadas em jarras de anaerobiose, os *Clostridium* formam colônias negras, devido à reação de redução de sulfito a sulfeto, que reage com citrato de amônio e ferroIII, formando um precipitado negro (BRASIL, 2003).

4.2.9.6 Microrganismos mesófilos

Para a contagem dos microrganismos mesófilos, tomou-se 1 mL das diluições a serem analisadas, o qual foi depositado no fundo de placas de Petri estéreis. Em seguida, foram adicionados cerca de 15 mL de Agar padrão (PCA) fundido e resfriado a temperatura em torno de 45° C. Após a homogeneização e solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 35° C por 48h para contagem de microrganismos mesófilos (APHA, 2001).

4.2.9.7 Microrganismos psicotróficos

Para contagem dos microrganismos psicotróficos, foram adicionados cerca de 15 mL de ágar padrão fundido e resfriado à temperatura em torno de 45° C em placas de Petri. Após a solidificação do ágar em temperatura ambiente, foi adicionado e espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalski, 0,1 mL de cada diluição. Em seguida as placas foram incubadas a 7° C por 7 dias (APHA, 2001).

4.2.10 Análise sensorial

Foi realizado teste de aceitabilidade com 50 provadores não treinados utilizando escala hedônica estruturada de 9 pontos (1 desgostei muitíssimo e 9 gostei muitíssimo) conforme Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008) com algumas adaptações. Os atributos avaliados foram cor, odor, sabor, textura e aparência global. Antes da avaliação os avaliadores foram instruídos a ler e assinar o termo de Consentimento Livre e Esclarecido declarando-se não alérgicos aos componentes das formulações, permitindo o uso da informação prestada para seu devido fim e também possuidores do direito de desistir de participar a qualquer momento do teste.

A avaliação foi realizada em cabines individuais no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Rurais da UFSM planejada de forma que cada um dos participantes provasse as 4 amostras servidas sequencialmente em blocos completamente balanceados, com relação a ordem de apresentação.

As lingüiças toscanas foram assadas por 45 minutos em temperatura de 180°C. Em seguida foram fatiadas e uma fatia de cada tratamento foi servida em pratos descartáveis brancos, devidamente identificadas com números aleatórios de três algarismos.

Também foi aplicado teste de intenção de compra, conforme metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008), o qual afirma que por meio das escalas ou de intenção de compra, o indivíduo expressa sua vontade em consumir, adquirir ou comprar, um produto que lhe é oferecido. Foi utilizada escala estruturada de 5 pontos (1 = certamente compraria; 3 = Tenho dúvidas de se compraria e 5 = certamente não compraria) (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1987).

Para o cálculo de Índice de Aceitabilidade do produto foi adotada a expressão: $IA (%) = A \times 100 / B$, na qual, A= nota média obtida para o produto, e B= nota máxima dada ao produto. O IA com boa repercussão tem sido considerado $\geq 70\%$ (DUTCOSKY, 1996).

4.2.11 Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata, os dados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 95% ($p < 0,05$), utilizando o pacote estatístico SPSS 17.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do extrato de própolis

A busca de um método de extração prático e eficiente é um processo constante nas avaliações de compostos bioativos, onde diversos parâmetros devem ser observados, podendo ser influenciados pelo solvente, tempo e altas temperaturas (CARVALHO et al, 2001).

Segundo Karacabey et al. (2010) a mistura hidroalcolica etanol e metanol são mais utilizados para extração de compostos fenólicos. Neste estudo o álcool de cereais 70% (v/v) foi o solvente escolhido uma vez que segundo literatura estes solventes têm diferentes polaridades, ou seja, meio aquoso e meio etanólico possibilitam a extração de compostos mais polares e de polaridades intermediarias, também pela simples razão que este é utilizado na industria alimentar. Já para temperatura como parte inicial do estudo foram realizados alguns ensaios (dados não mostrados), sendo que o melhor rendimento para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato de própolis foram obtidos na temperatura de 70°C, fixada para o desenvolvimento deste estudo. Também levou-se em conta o ponto de fusão da maioria das própolis, que segundo Marcucci (1995) encontra-se na faixa de temperatura de 60°C – 70°C. Autores acreditam que a temperatura empregada no processo extrativo não deve exceder 70°C podendo acarretar na degradação, polimerização e oxidação de compostos fenólicos, fatores que resultam na redução dos fenóis totais (NEGRI, 2007; BASTOS et al., 2007; NAKAMURA, 2008; SOBRINHO et al., 2010).

5.1.2 Compostos fenólicos totais e Capacidade Antioxidante do extrato de própolis

A Tabela 5 apresenta os resultados experimentais para conteúdo de polifenóis totais dos extratos de própolis em função do tempo de extração utilizando o forno de micro-ondas focalizada.

Tabela 5 – Valores médios de atividade antioxidante máxima, IC₅₀ e Conteúdo de polifenóis totais para os extratos de própolis obtida a 70°C utilizando forno de micro-ondas focalizadas e método de agitação.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo de rampa (min)	Aa _{max} (%)	IC ₅₀	Polifenóis totais (mg/GAE/g) ES
A	70	60	94,05±0,057 ^b	3,44±0,037 ^d	128,32±3,79 ^{bc}
B	70	45	94,84±0,150 ^{ab}	3,57±0,025 ^d	134,26±6,99 ^b
C	70	30	95,26±0,150 ^a	3,62±0,026 ^d	122,02±4,87 ^{cd}
D	70	20	94,51±0,442 ^{ab}	3,31±0,233 ^d	162,39±1,13 ^a
E	70	10	94,15±0,204 ^b	15,73±0,240 ^a	134,20±0,00 ^b
F	70	5	95,07±0,540 ^a	6,71±0,213 ^c	136,94±0,68 ^b
G	70	2,5	92,18±0,493 ^c	12,99±0,370 ^b	117,65±1,63 ^d
Agitação					
H	70	30	93,04±0,427	5,54±0,070	95,57±1,74

Aa_{max}: atividade antioxidante máxima; IC₅₀: concentração inibitória

De acordo com os resultados (Tabela 5) pode-se observar que aos 20 minutos de extração foi encontrado o maior teor de polifenóis totais (162,39±1,13), apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais tempos de extração. Os teores de compostos fenólicos totais não diferiram significativamente entre si nos tempos de extrações de 5 (136,94±0,68), 10 (134,20±0,00), 45 (134,26±6,99) e 60 (128,32±3,79) minutos. Verificou-se que o tempo de 2 minutos e 30 segundos apresentou o menor teor de polifenóis totais, porém não diferiu significativamente do tempo de 30 minutos de extração. Singh et al. (2011) encontraram valores significativos para teor de polifenóis da casca da batata utilizando micro-ondas sistema aberto no tempo de extração de 15 minutos quando comparado com o tempo de 5 minutos, corroborando com este estudo em que mostrou-se com menores valores de polifenóis totais aos 5 minutos de extração.

Castro et al. (2007) ao analisar extrato hidroalcolico de própolis oriundos do sudeste e nordeste do Brasil encontrou valores de 81,70 e 94,98 mgEAG/g de própolis de fenólicos totais, utilizando para extração a temperatura de 60°C por 30 minutos de agitação. Já utilizando a mesma metodologia de extração, porém com temperatura de 70°C, Dausch (2007) ao analisar extrato hidroalcolico de própolis vermelha encontrou valores de fenólicos totais na faixa de 18,1-99,7mg EAG/g de própolis. Para o valor de composto fenólico total

obtido neste estudo de $95,57 \pm 1,74$ através da técnica de agitação por 30 minutos em 70°C , pode-se verificar a proximidade com resultados anteriormente citados. Comparando a extração realizada através do forno microondas focalizada (20 minutos a 70°C) com o método por agitação (30 minutos a 70°C) pode-se observar diferença significativa entre os valores de compostos fenólicos totais $162,39 \pm 1,13$ e $95,57 \pm 1,74$ respectivamente, observando uma menor extração dos compostos fenólicos totais através do método de agitação. Essa melhor eficiência do forno de micro-ondas focalizada na extração de compostos fenólicos deste estudo pode estar relacionada com a radiação eletromagnética que é aplicada diretamente na mistura solvente-amostra e convertida em calor. As moléculas alvos migram da matriz para o solvente devido ao aquecimento muito localizado (OUFNAC, et al., 2007). Portanto este presente estudo indica que o forno micro-ondas de radiação focalizada possui uma maior eficiência na extração de compostos fenólicos da própolis quando comparado ao método de agitação, apresentando vantagem de menor tempo de extração. Este resultado é consistente com os relatados na literatura, que mostraram que a aplicação de micro-ondas pode aumentar o conteúdo de antioxidantes e reduzir o tempo de extração de forma significativa em comparação aos métodos convencionais de extração (BALLARD et al., 2010; HAYAT et al., 2009).

Estudos recentes demonstram que a extração utilizando as micro-ondas aumentou a recuperação de traços de resíduos em vegetais, frutas, café, chá e feijão (NEGERI; FOSTER; KHAN, 2000; FALQUI-CAO et al., 2001; DIAGNE; FOSTER; KHAN, 2002; PAN; NIU; LIU, et al. 2003; SINGH; FOSTER; KHAN, 2004). Antioxidantes e atividade antioxidante de aspargos também foram aumentadas após utilizar a extração assistida por microondas (SUN; TANG; POWERS, 2007).

As variações encontradas nos teores dos compostos fenólicos totais, de acordo com Mata et al. (2006) podem estar associadas à metodologia de extração e quantificação destes compostos, a qual pode ainda, interferir na correlação entre os parâmetros teor de fenóis e atividade antioxidante (DORMAN et al.; 2003).

Os resultados encontrados neste trabalho (Tabela 5) para as análises *in vitro* realizadas nos extratos de própolis demonstraram a menor atividade antioxidante máxima no tempo de 2 minutos e 30 segundos de extração. Porém maior atividade antioxidante foi encontrada nos tempos de 5, 20, 30 e 45 minutos de extração os quais não apresentaram diferença significativa entre si.

O IC₅₀ é um parâmetro usado para determinar o potencial antioxidante das plantas. Ele demonstra a quantidade necessária da planta para reduzir em 50% o DPPH, simulando assim como a planta atuará em um radical livre no organismo. Quanto maior o IC₅₀, maior será a quantidade necessária de substância para exercer a atividade antioxidante, dessa forma, um baixo IC₅₀ significa que a planta tem um grande poder antioxidante (NEGRI, 2007). Os resultados dos potenciais antioxidantes do extrato de própolis estão apresentados na Tabela 5 através do IC₅₀. A partir dos resultados pode-se visualizar que a extração de 20 minutos foi eficiente apresentando o menor IC₅₀ (3,31±0,233), apesar de diferir numericamente não apresentou diferença significativa dos tempos de 30, 45 e 60 minutos. Em relação ao IC₅₀ apresentado pela extração sob agitação constante de 30 minutos a 70°C (Tabela 3) pode-se verificar um valor de 5,54±0,070, superior ao encontrado no tempo de 20 minutos para extração com microondas focalizada, resultando em um poder antioxidante menor. Cabe salientar que diferentes autores têm apresentado valores de IC₅₀ de antioxidantes naturais com grandes diferenças, dificultando a comparação dos resultados.

O fato de haver diferenças nas metodologias utilizadas para elaboração de extratos dificulta sobremaneira a comparação de resultados. Pesquisas apontam que uma série de fatores podem interferir no conteúdo de compostos fenólicos nos extratos, entre eles a preparação da matéria-prima para extração, do processo de extração e da metodologia utilizada para identificar o conteúdo destes compostos (MADESN; BERTELSEN, 1995).

5.2 Caracterização da lingüiça toscana

5.2.1 Composição centesimal

Os resultados da composição centesimal da lingüiça toscana podem ser visualizados na Tabela 6.

Tabela 6 – Composição centesimal da lingüiça toscana armazenada a 4°C.

	0% EP**	0,5% EP	1% EP	2% EP
Umidade g(%)	56,10±0,127 ^{b*}	56,48±0,391 ^{ab}	56,68±0,105 ^a	56,87±0,000 ^a

Proteína g(%)	14,74±0,350 ^a	14,51±0,485 ^a	14,95±0,268 ^a	14,89±0,441 ^a
Cinzas g(%)	2,96±0,030 ^c	3,08±0,020 ^b	3,12±0,000 ^{ab}	3,17±0,055 ^a
Gordura g(%)	24,44±0,707 ^a	22,77±0,859 ^a	28,51±5,445 ^a	22,36±1,983 ^a

*Valores apresentados como média \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

**EP: Extrato de própolis

Os resultados obtidos para composição centesimal estão de acordo com o Padrão de Identidade e Qualidade do produto (BRASIL, 2000), que estabelece o valor máximo de 70% para umidade, 30% para lipídeos e o valor mínimo de 12% para proteína. Conforme Tabela 6 pode-se observar diferença significativa ($p < 0,05$) nos percentuais de umidade e cinzas. Em contrapartida os teores de proteína e gordura não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Em relação à gordura e umidade, Hayes et al. (2011) ao avaliar o efeito de plantas nutraceuticas na qualidade e tempo de prateleira de lingüiças de porco cruas encontraram para gordura valores aproximados ao deste estudo (22,6 – 24,8%) e superiores para umidade (60,9 - 62,2%), não verificando diferença significativa entre os tratamentos com sesamol, luteína, ácido elágico, extrato de folhas de oliveira e o controle. Já em estudo realizado por Paulino (2005), que ao elaborar lingüiça toscana com diferentes teores de gordura e substituição parcial do sal o percentual de umidade para lingüiça controle foi inferior (52,65%) e o teor de cinzas superior (3,64%) ao encontrado neste estudo.

Para teor de proteína obteve-se valores entre 14,51 – 14,95% nos diferentes tratamentos (Tabela 6). Almeida (2005) ao analisar a composição centesimal de três lotes de lingüiça Toscana de mesma marca comercializadas no Brasil encontrou valores de 13,06%, 13,40% e 13,85%.

5.2.2 pH

Conforme Silva (2005) o pH de um alimento não exerce apenas influência sobre a velocidade de multiplicação dos microrganismos, mas também interfere na qualidade dos alimentos, durante o armazenamento, tratamento térmico, dessecação, ou durante qualquer

outro tipo de tratamento, sendo também responsável direto pela deterioração de produtos alimentícios.

Em relação aos valores de pH (Tabela 7) encontrados neste estudo, pode-se verificar que no período inicial (até 14º dia de armazenamento) os valores de pH permaneceram com poucas variações, sem diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos, com exceção do dia zero em que ocorreu uma pequena diferença significativa no valores entre os tratamentos com adição do extrato de própolis (0,5% e 1,0%). A partir do 14º ao 21º dia de armazenamento houve uma queda do pH em todos os tratamentos, com diferença significativa entre o tratamento controle (6,16) e os tratamentos com 0,5% (6,26) e 1% de própolis (6,24). Uma diminuição no valor de pH também foi relatado por Almeida (2005), que observou redução do pH de 5,88 para 5,68 em lingüiça toscana, após 10 dias de armazenamento a 4°C, embalada em filme permeável ao oxigênio. Esse fato possivelmente pode indicar que uma fermentação ocorreu durante o armazenamento desses produtos, embora geralmente, açúcares não são adicionados à mistura de lingüiças, porém acredita-se ter sido ocasionada pela glicose contida na cura rápida.

Tabela 7 – Valores (n=3) de pH do produto durante o período de armazenamento a 4°C.

Tratamentos	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42	Dia 49	Dia 56
0% EP**	6,24±0,26 ^{ab}	6,24±0,03 ^a	6,28±0,005 ^a	6,16±0,01 ^b	6,34±0,02 ^a	6,41±0,01 ^a	6,47±0,02 ^a	6,55±0,15 ^a	6,73±0,25 ^a
0,5% EP	6,23±0,026 ^b	6,28±0,04 ^a	6,28±0,01 ^a	6,26±0,01 ^a	6,36±0,04 ^a	6,39±0,01 ^a	6,43±0,03 ^{ab}	6,51±0,11 ^b	6,66±0,03 ^a
1% EP	6,29±0,01 ^a	6,33±0,05 ^a	6,27±0,01 ^a	6,24±0,04 ^a	6,25±0,02 ^b	6,32±0,02 ^b	6,42±0,03 ^{ab}	6,49±0,01 ^b	6,58±0,04 ^b
2% EP	6,27±0,01 ^{ab}	6,30±0,00 ^a	6,27±0,00 ^a	6,23±0,03 ^{ab}	6,35±0,00 ^a	6,38±0,00 ^a	6,38±0,01 ^b	6,43±0,02 ^c	6,51±0,02 ^b

*Valores apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

**EP: Extrato de própolis

Considerando o comportamento do pH a partir do 21º dia de armazenamento, pode-se visualizar que foi crescente para todos os tratamentos, sendo mais acentuado no tratamento controle (sem adição de extrato de própolis) até o final do tempo de estocagem (56º dia). Comportamento semelhante foi encontrado por Georgantelis et al. (2007) em estudo com lingüiça suína, armazenada a 4°C, onde ocorreu decréscimo nos valores de pH até o 5º dia e posteriormente sucessivos aumentos até o 20º dia de armazenamento. Também pode-se verificar o efeito significativo sobre os valores de pH com a adição do extrato de própolis na concentração de 2,0% nos dias 49º e 56º de armazenagem, visto que os valores foram menores (6,43 e 6,51), apresentando diferença significativa em relação ao tratamento controle 6,55 e 6,73 respectivamente.

5.2.3 Oxidação lipídica

O teste de TBARS quantifica malonaldeído, um dos principais produtos da decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo. Os resultados obtidos para TBARS estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores médios de TBARS (MDA/Kg de amostra) das amostras de lingüiça toscana durante o período de armazenamento a 4°C.

Tempo (dias)	TRATAMENTOS			
	0% EP*	0,5% EP	1% EP	2% EP
Dia 0	F _{0,020±0,004^a}	E _{0,031±0,021^a}	GH _{0,047±0,016^a}	D _{0,052±0,009^a}
Dia 7	F _{0,036±0,030^a}	E _{0,021±0,005^a}	H _{0,031±0,008^a}	D _{0,055±0,014^a}
Dia 14	DE _{0,213±0,095^a}	BC _{0,2678±0,024^a}	B _{0,307±0,009^a}	A _{0,278±0,040^a}
Dia 21	EF _{0,093±0,043^a}	D _{0,135±0,005^a}	G _{0,119±0,018^a}	CD _{0,127±0,038^a}
Dia 28	D _{0,285±0,016^a}	C _{0,250±0,008^{ab}}	DE _{0,208±0,037^{bc}}	C _{0,148±0,041^c}
Dia 35	C _{0,556±0,113^a}	BC _{0,278±0,035^b}	CD _{0,224±0,018^b}	BC _{0,195±0,036^b}
Dia 42	C _{0,616±0,036^a}	B _{0,317±0,012^b}	EF _{0,140±0,021^c}	CD _{0,130±0,009^c}
Dia 49	B _{0,891±0,032^a}	BC _{0,302±0,012^b}	BC _{0,291±0,009^b}	ABC _{0,205±0,009^c}
Dia 56	A _{1,641±0,037^a}	A _{0,697±0,044^b}	A _{0,762±0,059^b}	AB _{0,249±0,021^c}

*Valores apresentados como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

A oxidação lipídica apresentou-se de forma crescente com a evolução do tempo em todas as amostras, no entanto verificaram-se através da análise dos resultados obtidos (Tabela 8), diferenças significativas entre as amostras dependendo do tratamento aplicado ao longo do tempo de armazenamento. Do dia zero até o 21º de armazenamento, todas as amostras apresentaram níveis de TBARS sem diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Em estudo realizado por Ciriano et al. (2009) que ao avaliar a oxidação lipídica de lingüiças fermentadas produzidas com antioxidante natural extraído de uma planta medicinal conhecida como borragem (*Borago officinalis*) e enriquecidas com ômega 3, encontrou valores de TBARS superiores (0,260 mg MDA/kg de amostra) quando comparado aos destes trabalhos 0,020; 0,031; 0,047 e 0,052 para o tratamento controle, 0,5%, 1% e 2% de extrato de própolis respectivamente no dia zero de armazenamento.

Entre o 28º e 56º dia de estocagem os tratamentos adicionados de extrato de própolis (EP 0,5%, 1,0% e 2,0%) diferem significativamente do tratamento controle (EP0%), sendo esta diferença mais acentuada entre o tratamento com 2,0% de extrato de própolis e o tratamento controle (0%EP). Com isso, observa-se que a aplicação do extrato de própolis proporcionou melhores resultados em relação à estabilidade oxidativa da lingüiça toscana, apresentando níveis significativamente menores de oxidação quando comparada ao controle.

Os níveis de TBARS no 56º dia de armazenamento foi significativamente maior ($p < 0,05$) no controle (1,641 mg de aldeído malônico/Kg) do que nas lingüiças adicionadas de extrato de própolis (0,5%, 1,0% e 2,0%) com valores de 0,697; 0,762 e 0,249 MDA/Kg respectivamente. De acordo com Torres e Okani (2000), estes níveis são considerados aceitáveis haja vista que valores acima de 1,59 MDA/Kg de amostra não seriam percebidos sensorialmente e também não causariam danos à saúde do consumidor, com exceção da lingüiça controle que apresenta valor superior. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Alves (2009) que observou valores de TBARS mais baixos para lingüiças com maior concentração de extrato de própolis, confirmando estudos em que a própolis possui atividade antioxidante (MOREIRA et al., 2008).

Em estudo realizado por Jin et al. (2007) no qual foi avaliado a estabilidade oxidativa de lingüiça suína, foi encontrado valores de TBARS com níveis 1100mg de MDA/Kg durante o armazenamento a 0°C, por um período de 28 dias, valores estes considerados superiores aos apresentados neste estudo, visto que no mesmo período os níveis de TBARS encontrados foram de 0,250; 0,208 e 0,148mg de MDA/Kg para as lingüiças com 0,5%, 1,0% e 2,0% de extrato de própolis respectivamente. Também em estudo realizado por Busatta (2010), que ao

avaliar a adição de extrato de orégano e manjerona em lingüiça toscana, encontrou valores superiores ao deste estudo para os níveis de TBARS no produto adicionado de maior concentração do extrato de manjerona no final de 35º dia de armazenamento (0,806 mg de MDA/Kg) quando comparado com as lingüiças elaboradas neste estudo com adição de própolis (EP 0,5% - 0,278; EP 1,0% - 0,224; EP 2,0% - 0,195 mg de MDA/Kg) no mesmo período de estocagem.

5.2.4 Cor

A cor é um dos principais fatores que interfere na decisão de compra do consumidor, principalmente daqueles produtos ainda não conhecidos. Este atributo também tem capacidade de atrair ou repelir a atenção de quem está se decidindo pela compra. A oxidação lipídica pode afetar a cor dos produtos cárneos ao longo do armazenamento na medida em que a nitrosomioglobina, pigmento cárneo responsável pela cor de produtos curados é suscetível à oxidação (ZANARDI et al., 2002).

Os resultados obtidos para a luminosidade (L^*), cor vermelha (a^*), cor amarelo (b^*), índice de saturação (C^*), ângulo de tonalidade (h^*) e a diferença global (ΔE^*) durante o período de armazenamento das lingüiças são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores médios para a Luminosidade (L^*), cor vermelha (a^*), cor amarela (b^*), índice de saturação (C^*), ângulo de tonalidade (h^*) e a diferença global (ΔE^*) da lingüiça toscana durante o período de armazenamento a 4°C.

PARÂMETRO L^*	0% EP**	0,5% EP	1% EP	2% EP
Dia 0	$B56,32 \pm 0,305^a$	$B55,44 \pm 0,343^{ab}$	$B54,75 \pm 0,934^{ab}$	$B53,82 \pm 0,895^b$
Dia 7	$B56,38 \pm 1,952^a$	$B57,35 \pm 0,420^a$	$B55,14 \pm 0,618^a$	$B54,60 \pm 0,947^a$
Dia 14	$B56,21 \pm 1,829^a$	$B57,49 \pm 1,111^a$	$B55,25 \pm 1,356^a$	$^{AB}57,21 \pm 2,172^a$
Dia 21	$B56,43 \pm 1,885^a$	$B55,85 \pm 0,835^a$	$B54,65 \pm 0,955^a$	$B54,54 \pm 0,900^a$
Dia 28	$^{AB}57,54 \pm 3,041^a$	$B57,04 \pm 3,455^a$	$B55,91 \pm 1,321^a$	$B54,44 \pm 1,763^a$
Dia 35	$^{AB}57,04 \pm 1,565^a$	$B54,46 \pm 0,719^a$	$B53,39 \pm 0,436^a$	$B53,97 \pm 2,405^a$
Dia 42	$^A62,85 \pm 2,757^a$	$^{AB}58,94 \pm 2,959^a$	$^A60,24 \pm 2,056^a$	$^A60,35 \pm 1,689^a$
Dia 49	$^{AB}61,50 \pm 0,251^{ab}$	$^A63,01 \pm 0,847^a$	$^A60,78 \pm 0,886^b$	$^A59,83 \pm 1,194^b$

Dia 56	^{AB} 61,35±3,128 ^a	^B 56,20±1,215 ^b	^B 55,16±2,599 ^b	^B 54,49±1,362 ^b
PARÂMETRO a*				
Dia 0	^A 17,52±0,558 ^a	^A 16,64±0,405 ^a	^A 16,14±0,401 ^a	^A 16,51±1,156 ^a
Dia 7	^{AB} 16,67±0,267 ^a	^A 16,26±0,052 ^a	^A 16,30±0,468 ^a	^A 16,67±0,843 ^a
Dia 14	^{BC} 14,14±1,672 ^a	^B 13,67±1,396 ^a	^A 14,84±0,240 ^a	^B 13,64±0,804 ^a
Dia 21	^{CD} 13,02±1,423 ^a	^B 13,40±0,370 ^a	^B 12,65±0,637 ^a	^{BCD} 12,42±0,391 ^a
Dia 28	^{CD} 13,22±0,704 ^a	^B 13,03±1,102 ^a	^B 12,32±0,420 ^{ab}	^{CD} 11,03±0,140 ^b
Dia 35	^{CD} 13,06±0,636 ^a	^B 12,79±0,954 ^a	^B 12,07±0,552 ^a	^D 10,48±0,460 ^b
Dia 42	^{CD} 13,92±0,997 ^a	^B 13,01±1,213 ^a	^B 12,84±0,352 ^a	^{BC} 12,52±0,487 ^a
Dia 49	^{CD} 12,87±0,794 ^a	^B 13,35±0,536 ^a	^B 12,87±0,650 ^a	^B 13,14±0,516 ^a
Dia 56	^D 11,42±0,274 ^a	^B 11,80±0,810 ^a	^B 11,41±1,113 ^a	^{BCD} 11,86±0,856 ^a
PARÂMETRO b*				
Dia 0	^{BC} 10,59±0,276 ^a	^{BCD} 10,62±0,352 ^a	^B 10,91±0,280 ^a	^{BC} 10,89±0,270 ^a
Dia 7	^{BC} 10,50±0,473 ^a	^{BC} 10,78±0,243 ^a	^B 10,73±0,063 ^a	^D 10,30±0,150 ^a
Dia 14	^C 9,80±0,165 ^b	^{CDE} 9,730,407 ^b	^{BC} 10,49±0,157 ^a	^{CD} 10,65±0,156 ^a
Dia 21	^C 10,14±1,024 ^a	^{DE} 9,63±0,330 ^a	^D 9,48±1,965 ^a	^{EF} 9,49±0,080 ^a
Dia 28	^C 9,89±0,315 ^a	^{BCD} 10,18±0,355 ^a	^{CD} 9,77±0,421 ^a	^E 9,68±0,205 ^a
Dia 35	^{BC} 10,91±0,439 ^a	^{BCD} 10,36±0,330 ^a	^{BCD} 10,03±0,386 ^a	^D 10,25±0,269 ^a
Dia 42	^C 10,33±0,776 ^a	^E 9,00±0,140 ^a	^E 9,13±0,629 ^a	^F 9,06±0,227 ^a
Dia 49	^A 14,59±0,375 ^{ab}	^A 15,08±0,234 ^a	^A 14,39±0,158 ^b	^A 14,77±0,152 ^{ab}
Dia 56	^B 12,03±0,445 ^a	^B 11,03±0,717 ^a	^B 10,90±0,141 ^a	^B 11,24±0,184 ^a
PARÂMETRO C				
Dia 0	^A 20,75±0,632 ^a	^A 20,02±0,539 ^a	^A 19,69±0,536 ^a	^A 20,15±1,100 ^a
Dia 7	^{AB} 19,50±0,316 ^a	^A 20,17±0,294 ^a	^A 20,03±0,309 ^a	^{AB} 19,34±0,520 ^a
Dia 14	^{BC} 17,30±1,437 ^a	^B 16,94±1,334 ^a	^B 18,30±0,923 ^a	^{BC} 17,44±0,736 ^a
Dia 21	^C 16,60±1,603 ^a	^B 16,56±0,101 ^a	^C 15,87±0,632 ^a	^{CD} 15,72±0,320 ^a
Dia 28	^C 16,52±0,375 ^a	^B 16,57±0,855 ^a	^C 15,75±0,116 ^a	^D 15,36±1,119 ^a
Dia 35	^{BC} 17,04±0,766 ^a	^B 16,52±0,907 ^a	^C 15,70±0,227 ^{ab}	^D 14,75±0,199 ^b
Dia 42	^{BC} 17,60±0,769 ^a	^B 16,09±1,187 ^{ab}	^C 15,90±0,260 ^{ab}	^{CD} 15,59±0,274 ^b
Dia 49	^{AB} 19,48±0,822 ^a	^A 20,25±0,554 ^a	^{AB} 19,36±0,370 ^a	^A 19,86±0,244 ^a
Dia 56	^C 16,61±0,415 ^a	^B 16,16±1,07 ^a	^C 15,80±0,908 ^a	^{CD} 16,35±0,730 ^a
PARÂMETRO H				
Dia 0	^D 31,09±0,540 ^b	^D 32,48±0,640 ^{ab}	^{DE} 33,77±0,250 ^a	^E 33,16±1,244 ^a
Dia 7	^{CD} 31,68±0,327 ^a	^D 32,58±0,581 ^a	^E 33,06±0,709 ^a	^E 33,14±0,810 ^a
Dia 14	^{BCD} 34,87±2,985 ^a	^{CD} 35,40±1,797 ^a	^{CDE} 35,11±0,750 ^a	^{CD} 37,96±1,400 ^a
Dia 21	^B 37,91±2,078 ^a	^{CD} 35,66±1,700 ^a	^{CDE} 36,84±1,024 ^a	^{CDE} 37,28±0,845 ^a
Dia 28	^{BC} 36,85±2,340 ^a	^C 37,99±2,683 ^a	^{CD} 38,38±2,270 ^a	^{BC} 41,30±0,951 ^a
Dia 35	^B 39,83±0,624 ^b	^{BC} 39,04±1,184 ^b	^{BC} 39,82±2,050 ^b	^B 44,18±2,161 ^a
Dia 42	^B 37,74±3,224 ^a	^{CD} 34,66±2,295 ^a	^{CDE} 35,29±2,529 ^a	^{DE} 35,86±1,775 ^a
Dia 49	^A 48,64±1,021 ^a	^A 48,55±0,825 ^a	^A 48,34±1,845 ^a	^A 48,41±1,462 ^a

Dia 56		^A 46,54±1,213 ^a	^B 43,01±0,162 ^a	^{AB} 43,77±2,411 ^a	^B 43,48±1,783 ^a
PARÂMETRO ΔE					
Dia 0	-		^A 2,15±0,447 ^a	^A 3,50±1,210 ^a	^A 3,65±0,470 ^a
Dia 7	-		^A 2,230±0,711 ^a	^A 2,51±0,481 ^a	^A 3,27±1,235 ^a
Dia 14	-		^A 3,25±1,816 ^a	^A 2,40±0,978 ^a	^A 4,01±1,935 ^a
Dia 21	-		^A 3,12±0,653 ^a	^A 3,06±1,695 ^a	^A 3,25±2,15 ^a
Dia 28	-		^A 4,19±1,735 ^a	^A 4,38±1,377 ^a	^A 4,82±2,835 ^a
Dia 35	-		^A 3,46±0,260 ^a	^A 4,56±0,790 ^a	^A 5,14±1,766 ^a
Dia 42	-		^A 4,77±0,726 ^a	^A 3,91±1,836 ^a	^A 4,42±2,238 ^a
Dia 49	-		^A 2,82±0,707 ^a	^A 2,71±0,755 ^a	^A 2,87±0,620 ^a
Dia 56	-		^A 5,44±2,040 ^a	^A 5,73±2,956 ^a	^A 7,05±3,315 ^a

*Valores apresentados como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

**EP: Extrato de própolis

Nos dias zero e 56° de armazenamento observa-se valores significativamente inferiores de L* (luminosidade) (Tabela 9) para o tratamento com maior concentração de extrato de própolis em relação ao tratamento controle, desta forma o menor valor de L* representou um produto mais “escuro”, visto que os valores de L* (luminosidade) variam de preto (0%) a branco (100%) (RAMOS; GOMIDE, 2007). No entanto durante os períodos 7°, 14°, 21°, 28°, 35° e 42° de armazenamento, os valores de L* das lingüiças adicionadas do extrato de própolis (0,5%, 1,0% e 2,0% EP) não apresentaram diferença significativa em relação à lingüiça controle (0%EP).

O efeito do tratamento ao longo do período de estocagem pode ser visualizado com pequenas variações de luminosidade. Neste caso, os tratamentos 1,0%EP e 2,0%EP apresentaram aumento nos valores de L* no 42° dia de armazenamento (60,24 e 60,35) respectivamente, com posterior redução no 56° dia de estocagem (55,16 e 54,49) respectivamente. Este mesmo aumento também é observado no 42° dia de armazenamento para a lingüiça controle (62,85) e no 49° dia para a lingüiça com 0,5% de extrato de própolis (63,01).

Com relação ao parâmetro vermelho (a*) o tempo contribuiu de forma estatisticamente significativa para a redução, tanto para as lingüiças com adição de extrato de própolis quanto para as lingüiças controle. Lingüiças do grupo controle apresentaram a* de 17,52 a 11,42 do

zero ao 56º dia de armazenamento. Comportamento semelhante foi observado para as lingüiças adicionadas de 0,5% de extrato de própolis com a^* de 16,64 a 11,80, adicionadas de 1,0% de própolis (16,14 – 11,41) e adicionadas de 2,0% de extrato de própolis (16,51-11,86). Esta redução dos valores de a^* em todos os tratamentos possivelmente está relacionada com a oxidação lipídica (Tabela 6) durante o período de estocagem. Segundo Pollonio (1994), oxidação a dos pigmentos heme é fator determinante na oxidação lipídica da carne, onde a diminuição dos pigmentos heme é altamente correlacionada com a redução do valor de a^* . No caso parâmetro amarelo (b^*) ocorreu um aumento no decorrer do período de estocagem, observando-se o efeito significativo do tempo tanto para o tratamento controle quanto para os tratamentos adicionados de extrato de própolis. Segundo García-Esteban, Ansorena e Astiasarán, (2004) diferenças nos valores de b^* durante o período de estocagem podem ser relatadas pela intensidade do processo de oxidação que aparece durante o armazenamento que tende a aumentar a cor amarela de produtos pela rancidez.

O ângulo de tonalidade (h^*) e grau de saturação (C^*) são medidas derivadas de a^* e b^* , o ângulo de tonalidade (h^*) é a grandeza associada aos comprimentos de onda do espectro visível, representando a qualidade da cor (azul, vermelho, amarelo, etc.) e permitindo diferenciá-la (RAMOS; GOMIDE, 2007). A cromaticidade ou croma (C^*) expressa a intensidade da cor, ou seja, a saturação em termos de pigmentos desta cor. Valores de croma próximos de zero representam cores neutras (cinzas), enquanto valores próximos de 60 expressam cores vívidas (MENDONÇA et al., 2003).

De acordo com a Tabela 9 os tratamentos não influenciaram significativamente os valores de C^* , com exceção dos 35º e 42º dias de armazenamento as lingüiças adicionadas de 2,0% de extrato de própolis (14,75 – 15,59) diferiram significativamente das lingüiças controle (17,04 - 17,60), porém o período de armazenamento mostrou que as maiores médias foram encontradas no início do experimento, indicando um produto avermelhado.

Em relação aos resultados apresentados para diferença global (ΔE^*) pode-se verificar (Tabela 5) que não houve influencia significativa ($p < 0,05$) tanto entre os tratamentos quanto ao longo do período de estocagem. As médias dos valores encontrados situaram-se entre 2,15 (T0%EP) e 7,05 (T2,0%EP), a partir destes valores segundo RAMOS e GOMIDE (2007) superiores a 5 podem ser facilmente detectáveis pelo olho humano e valores acima de 12 implicam diferença de cor absoluta, perceptíveis até mesmo por julgadores não treinados, porém não se pode comparar com o resultado verificado pela análise sensorial uma vez que foi realizada em período distinto de armazenamento, visto que a análise sensorial foi realizada

no 7º dia de armazenamento e o valor para (ΔE^*) de 7,05 foi encontrado no 56º dia de armazenamento.

Conforme Ramos e Gomide (2007) uma desvantagem no uso de ΔE^* é que a maneira na qual uma amostra difere de um padrão não é evidente, ou seja, mudança na cor de produtos alimentícios raramente ocorre somente em um valor de cor (L^* , a^* ou b^*). A cor é geralmente afetada pelos três valores, mas isso não significa necessariamente que todos eles são importantes para aceitação do produto pelo consumidor. Entretanto, a diferença total de cor permite determinar o quanto a impressão de cor total de uma amostra é diferente do padrão e se essa diferença é perceptível sensorialmente.

Considerando o efeito dos tratamentos no 7º dia de armazenamento quando comparados os resultados dos valores da cor objetiva (L^* , a^* , b^* , c^* , h^* e ΔE^*) com os da análise sensorial para o atributo cor (Tabela 11), observa-se haver uma correlação entre os valores, uma vez que não houve diferença significativa entre os tratamentos para ambas as análises, sendo assim imperceptível para os avaliadores.

5.2.5 Estabilidade microbiológica

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, através da Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) aprovou o regulamento técnico de padrões microbiológicos para alimentos, incluindo um item específico para produtos cárneos frescos, como a lingüiça.

Os resultados obtidos para contagem de aeróbios mesófilos totais, psicotróficos, *Staphylococcus coagulase negativa e positiva*, Coliformes Totais a 35°C, Coliformes a 45°C. *Salmonella* e *Clostridium sulfito redutor*, estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores médios da contagem de aeróbios mesófilos totais, psicotróficos, *Staphylococcus coagulase negativa e positiva*, Coliformes Totais a 35°C, Coliformes a 45°C. *Salmonella* e *Clostridium sulfito redutor* em amostras de lingüiça toscana durante o período de armazenamento a 4°C.

Aeróbios Mesófilos (Log₁₀ UFC.g⁻¹)	0% EP*	0,5% EP	1% EP	2% EP
Dia 0	4,72±0,083 ^a	4,78±0,144 ^a	4,79±0,081 ^a	4,73±0,015 ^a
Dia 7	4,57±0,063 ^a	4,51±0,133 ^a	4,60±0,048 ^a	4,56±0,058 ^a
Dia 14	4,45±0,079 ^b	4,44±0,093 ^b	4,60±0,078 ^a	4,37±0,054 ^b
Dia 21	3,97±0,043 ^a	3,98±0,021 ^a	3,97±0,022 ^a	3,85±0,036 ^b
Dia 28	3,94±0,038 ^a	3,87±0,048 ^{ab}	3,84±0,010 ^b	3,59±0,079 ^c
Dia 35	3,82±0,042 ^b	3,87±0,035 ^b	3,99±0,020 ^a	3,64±0,082 ^c
Dia 42	4,64±0,048 ^b	4,83±0,064 ^a	4,53±0,048 ^c	3,70±0,038 ^d
Dia 49	5,97±0,022 ^a	5,41±0,091 ^b	3,84±0,130 ^c	3,73±0,043 ^c
Dia 56	6,44±0,034 ^a	5,98±0,021 ^c	6,11±0,047 ^b	4,85±0,045 ^d
Bactérias Psicotróficas (Log₁₀ UFC.g⁻¹)	C	T1	T2	T3
Dia 0	4,26±0,057 ^b	4,49±0,117 ^a	4,06±0,035 ^c	3,94±0,061 ^c
Dia 7	4,55±0,050 ^a	4,58±0,068 ^a	4,54±0,061 ^a	4,45±0,104 ^a
Dia 14	4,53±0,052 ^a	4,68±0,076 ^a	4,56±0,103 ^a	4,62±0,053 ^a
Dia 21	4,32±0,055 ^a	4,34±0,037 ^a	4,13±0,095 ^b	4,14±0,056 ^b
Dia 28	4,47±0,048 ^a	4,28±0,075 ^b	4,20±0,142 ^{bc}	4,04±0,051 ^c
Dia 35	4,23±0,263 ^a	4,26±0,041 ^a	4,03±0,038 ^a	3,39±0,030 ^b
Dia 42	4,74±0,050 ^a	4,75±0,053 ^a	4,89±0,092 ^a	3,97±0,260 ^b
Dia 49	6,00±0,029 ^a	5,88±0,048 ^a	5,28±0,122 ^b	4,75±0,128 ^c
Dia 56	6,73±0,044 ^b	6,68±0,119 ^b	6,96±0,036 ^a	5,39±0,067 ^c
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i> (Log₁₀ UFC.g)				
Dia 0	3,56±0,078 ^a	3,50±0,031 ^a	3,34±0,070 ^b	3,26±0,024 ^b
Dia 7	3,56±0,046 ^a	3,33±0,053 ^{bc}	3,41±0,037 ^b	3,30±0,037 ^c
Dia 14	3,79±0,111 ^a	3,71±0,036 ^a	3,59±0,026 ^b	3,43±0,040 ^c
Dia 21	3,32±0,145 ^{ab}	3,41±0,096 ^a	3,47±0,047 ^a	3,21±0,090 ^b
Dia 28	3,43±0,133 ^a	3,38±0,059 ^{ab}	3,26±0,099 ^{ab}	3,21±0,088 ^c
Dia 35	3,29±0,059 ^a	3,27±0,094 ^a	3,48±0,114 ^a	3,11±0,068 ^c
Dia 42	3,33±0,085 ^a	3,19±0,073 ^{bc}	3,31±0,026 ^{ab}	3,15±0,079 ^c
Dia 49	3,57±0,073 ^a	3,22±0,102 ^b	3,06±0,064 ^c	2,81±0,087 ^d
Dia 56	3,73±0,029 ^a	3,41±0,087 ^b	3,29±0,070 ^{bc}	3,14±0,118 ^c
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i> (Log₁₀ UFC.g⁻¹)				
Dia 0	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Dia 7	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Dia 14	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Dia 21	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Dia 28	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Dia 35	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Dia 42	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Dia 49	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00

Dia 56	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Coliformes Totais a 35°C (Log₁₀ UFC.g⁻¹)				
Dia 0	3,28±0,149 ^b	3,50±0,037 ^a	3,16±0,128 ^b	3,21±0,111 ^b
Dia 7	3,18±0,107 ^a	3,44±0,452 ^a	3,16±0,054 ^a	2,98±0,059 ^a
Dia 14	3,04±0,033 ^b	2,95±0,026 ^b	3,16±0,039 ^a	2,87±0,043 ^c
Dia 21	3,92±0,040 ^a	3,21±0,123 ^b	3,25±0,046 ^b	3,04±0,033 ^c
Dia 28	3,63±0,145 ^a	2,87±0,066 ^b	2,85±0,101 ^b	2,83±0,047 ^b
Dia 35	2,80±0,059 ^{ab}	2,91±0,030 ^a	2,68±0,070 ^b	2,53±0,116 ^c
Dia 42	2,81±0,039 ^a	2,79±0,071 ^a	2,90±0,013 ^a	2,55±0,071 ^b
Dia 49	3,71±0,100 ^a	2,66±0,065 ^b	2,50±0,059 ^c	2,33±0,064 ^d
Dia 56	2,61±0,040 ^b	2,82±0,022 ^a	2,67±0,063 ^b	2,28±0,078 ^c
Coliformes a 45°C (Log₁₀ UFC.g⁻¹)				
Dia 0	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Dia 7	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Dia 14	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Dia 21	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Dia 28	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Dia 35	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Dia 42	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Dia 49	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Dia 56	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Salmonella spp./25g de amostra				
Dia 0	ausente	ausente	ausente	ausente
Clostridium sulfito redutor 46°C/ 25g de amostra				
Dia 0	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00

*Valores apresentados como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

**EP: Extrato de própolis

A contagem de microorganismos aeróbios mesófilos é comumente utilizada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2005) e detecta o número de bactérias aeróbicas ou facultativas mesófilas, que se apresentam tanto sob forma vegetativa como esporulada na alimentação. Neste estudo foi realizada análise microbiologia da carne, tripa suína e do extrato de própolis utilizada na elaboração das lingüiças toscana. Os resultados (não mostrados) encontraram-se dentro do limite de tolerância estabelecido pela Legislação RDC nº 12 (BRASIL, 2001) e de acordo com Terra (1998) indicando que as matérias-primas foram devidamente tratadas em condições de higiene ideais e foram bem conservadas, mostrando boa qualidade microbiológica para ser utilizada com segurança na elaboração de produtos.

Na etapa da trituração dos ingredientes, o aumento da área superficial promove a distribuição da contaminação microbiológica inicial, antes mais restrita à superfície da matéria prima, potencializando a deterioração do produto final com maior rapidez (GONÇALVES, 2003; MILANI et al., 2003). Durante a moagem e mistura dos ingredientes pode ocorrer contaminação proveniente do contato da carne com os equipamentos, utensílios e pessoal, ou da adição da matéria-prima ou aditivos contaminados (ORDONEZ et al., 2005).

Diante dos resultados apresentados na Tabela 10, pode-se observar que para a média da contagem de aeróbios mesófilos totais no tempo zero de estocagem não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos, todos apresentaram contagem inferior a 10^{-6} UFC/g citada por Terra (1998) como faixa aceitável de contaminação bacteriana. Durante o armazenamento as lingüiças sofreram pequenas oscilações apresentando uma redução na contagem de aeróbios mesófilos entre o 21º e 35º dia de armazenamento. Este fato possivelmente está associado com a queda de pH no 21º dia de armazenamento, visto que quando reduzido pode ter inibido o crescimento bacteriano, com prejuízos para o metabolismo dos microorganismos (LEINSNER, 2000).

No período final de estocagem (49º-56º dia) a contagem de microorganismos aeróbios mesófilos apresentou comportamento crescente com significativa diferença do tratamento controle quando comparado aos tratamentos adicionados de extrato de própolis, sendo estes com valores inferiores a 10^{-6} UFC/g. Neste caso é possível perceber a influência da aplicação do extrato de própolis nas lingüiças, pois neste período os menores valores para contagem de aeróbios mesófilos deu-se nas lingüiças com adição de extrato de própolis, sendo de 5,41; 3,84 e 3,73 Log UFC/g. no 49º dia e de 5,98; 6,11 e 4,85 Log UFC/g. no 56º dia para 0,5%; 1% e 2% de extrato adicionado, enquanto que o tratamento controle apresentou média de 5,97 e 6,44 Log UFC/g para o mesmo período. Também podem ser verificados (Apêndice A) neste período alterações visuais como bolores, leveduras e fungos em maior quantidade no tratamento controle quando comparado aos demais. Valores superiores a este estudo para contagem de aeróbios mesófilos totais foi relatado por Pereira (2009) que ao avaliar o extrato de própolis (0,10%) em carne mecanicamente separada (CMS) de frango no final de 10 dias de armazenamento refrigerado encontrou 6,74 \log_{10} UFC/g, sendo este o valor mais alto até mesmo quando comparado ao tratamento controle.

Em relação a contagem de microorganismos psicotróficos Braford et al. (1993) afirmam ser um dos critérios mais importantes para deterioração a temperaturas de refrigeração. Em trabalho realizado por estes autores, a contagem de psicotróficos aumentou significativamente após sete dias de armazenamento. Os autores atribuem esses valores ao

grupo de bactérias produtoras de ácido láctico, que seriam responsáveis pela deterioração de produtos cárneos. Neste estudo também foi verificado aumento da contagem de microorganismos psicotróficos entre os tratamentos, porém a partir do 21º dia de estocagem. Este aumento teve uma maior diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado o tratamento controle (0%EP) com contagens superiores ao tratamento adicionado de 2% de EP.

A contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* (Tabela 10) apresentou resultados inferiores a 1Log. UFC.g^{-1} não demonstrando diferença significativa entre os tratamentos durante todo o período de armazenamento. Conforme a RDC nº 12 (BRASIL, 2001) que aprova Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, a tolerância em embutidos frescos para *Staphylococcus coagulase positiva* é de $3 \times 10^3 \text{ UFC/g}$, portanto todos os tratamentos mantiveram-se dentro do limite permitido no decorrer do armazenamento. Segundo Lee et al. (2007) relatam que o extrato etanólico de própolis apresenta ação antimicrobiana contra o *Staphylococcus aureus*.

De acordo com a Tabela 10 a contagem média de Coliformes Totais a 35°C foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos. Novamente é possível visualizar a interação do extrato de própolis na redução do número de Coliformes totais quando comparada a lingüiça controle. Esta redução torna-se bem nítida para o tratamento com adição de 2% de extrato de própolis com valores de 2,87; 3,04; 2,83; 2,53; 2,55; 2,33 e 2,28 $\log_{10} \text{ UFC/g}$ quando comparados com 3,04; 3,92; 3,63; 2,80; 2,81; 3,71 e 2,61 $\log_{10} \text{ UFC/g}$ para o controle no período de 14º ao 56º dia de armazenamento respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Pereira (2009) com redução expressiva da contagem média de Coliformes totais no final do período de armazenamento de CMS com extrato de própolis, porém durante o decorrer do armazenamento a CMS com extrato de própolis não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento negativo (BHT), diferenciando-se deste estudo. Borges; Almeida e Fragiorge (2009), ao estudar a atividade antibacteriana e antifúngica de diferentes concentrações de extrato hidroalcolólico de própolis em lingüiça frescal suína também encontraram diferença significativa para contagem de coliformes a 35º entre os tratamentos, afirmando que a aplicação da maior concentração do extrato de própolis é mais eficaz no controle desses microorganismos. Para coliformes a 45°C não foram verificados diferença significativa entre os tratamentos, apresentando valores inferiores a $< 1,00 \log_{10} \text{ UFC/g}$ de acordo com o limite estabelecido pela RDC nº 12 (BRASIL, 2001) de $5 \times 10^3 \text{ UFC/g}$.

Dentre os microorganismos patogênicos que potencialmente podem estar no produto destacam-se *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria*

monocytogenes, que entram nas plantas de abate a partir dos animais vivos e operários. (BIRZELE; DJORDJEVIC; KRAMER, 2005). CASTAGNA et al. (2004) pesquisaram a prevalência de *Salmonella* spp. em frigorífico de abate de suínos e detectaram o microrganismo em 83,33% dos animais. A prevalência média encontrada no produto final (lingüiça frescal) fabricado com matéria-prima oriunda destes animais foi de 93,94%, não havendo diferença estatística entre a prevalência de animais portadores e a encontrada no produto final. Neste estudo não foi detectada a presença de *Salmonella* spp e *Clostridium sulfito redutor* em nenhuma das amostras durante todo o período de estocagem. Este resultado está de acordo com o definido pela RDC nº12 (BRASIL, 2001), que estabelece resultado negativo para *Salmonella* em 25g de amostras e máximo de 3×10^3 UFC/g para *Clostridium sulfito redutores*.

Nos últimos anos, a atividade antimicrobiana *in vitro*, da própolis tem sido relatada, sendo esta atividade devido aos flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres presentes na resina natural (GEBARA; LIMA; MAYER, 2002). Os ácidos cafeico e ferrúlico também contribuem para ação bactericida da própolis. O mecanismo da atividade antimicrobiana é complexo, podendo ser devido ao efeito sinérgico entre flavonóides, hidróxiácidos e sesquiterpenos (MARCUCCI, 1995). Tais fatores podem explicar a ação positiva da própolis neste trabalho frente a alguns microorganismos, como Coliformes Totais, aeróbios mesófilos, psicotróficas, *Staphylococcus aureus*, onde apresentou as menores contagens médias durante o período de estocagem. Nagai et al. (2006) também relatam que a própolis apresenta um efeito inibitório elevado contra o crescimento microbiano durante a conservação da carne e músculo.

5.2.6 Análise sensorial

No processo de desenvolvimento e melhoramento de produtos, a determinação da aceitação é de extrema importância. Os testes de aceitação requerem um grande número de participantes que representem a população de consumidores atuais ou potenciais dos produtos (SCHEID, 2001). Neste caso, a análise sensorial do presente estudo, foi conduzida com o intuito de verificar a aceitação do consumidor frente às características gerais das lingüiças adicionadas de extrato de própolis.

Foram avaliados atributos: cor, odor, sabor, textura e aparência global em lingüiça toscana. O painel de provadores foi integrado por 50 pessoas, não treinados. Os resultados

para as médias das notas e para o índice de aceitabilidade (IA) das lingüiças apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Médias das notas e Índice de Aceitabilidade atribuídas para as lingüiças toscana.

Atributos	0% EP*		0,5% EP		1% EP		2% EP	
	Média notas	IA (%)	Média notas	IA (%)	Média notas	IA (%)	Média notas	IA (%)
Cor	7,06±1,621 ^a	80,22	7,16±1,314 ^a	78,44	7,32±1,531 ^a	79,56	7,22±1,314 ^a	81,33
Odor	6,58±1,864 ^{ab}	78,44	6,86±1,57 ^{ab}	73,11	6,04±1,851 ^b	76,22	7,06±1,544 ^a	67,11
Sabor	7,14±1,885 ^{ab}	81,11	7,04±1,761 ^{ab}	79,33	6,18±2,238 ^b	78,22	7,30±1,474 ^a	68,67
Textura	6,98±1,846 ^a	80,00	7,40±1,212 ^a	77,56	6,84±1,920 ^a	82,22	7,20±1,641 ^a	76,00
Aparência Global	6,94±1,731 ^a	80,67	7,20±1,512 ^a	77,11	6,52±1,992 ^a	80,00	7,26±1,337 ^a	72,44

Valores apresentados como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. Escores: 1 = desgostei muitíssimo; 2 = desgostei muito; 3 = desgostei moderadamente; 4 = desgostei ligeiramente; 5 = indiferente; 6 = gostei ligeiramente; 7 = gostei moderadamente; 8 = gostei muito; 9 = gostei muitíssimo.

**EP: Extrato de própolis; IA: índice de Aceitabilidade

Os valores médios das notas atribuídas para os atributos cor, textura e aparência global (Tabela 11) foram de aproximadamente 7, classificados como “gostei moderadamente” na escala hedônica estruturada de nove pontos, não apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos avaliados, demonstrando a não interferência da aplicação do extrato de própolis nas concentrações estudadas quando comparadas ao tratamento controle, neste caso as lingüiças foram aceitas de uma forma geral.

Em relação ao atributo sensorial odor os tratamentos com adição de 1,0% e 2% de extrato de própolis diferiram entre si estatisticamente, sendo classificados como “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente” respectivamente, porém não apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento com 0,5% de extrato de própolis e ao tratamento controle. Em contrapartida Bernardi (2010) ao analisar sensorialmente salames adicionados de extrato de própolis livre e com microcápsulas de própolis produzidas com proteína de soja e pectina por coacervação complexa e liofilização relatou sobre a percepção dos provadores referente ao odor de própolis nos salames em ambos os tratamentos, os quais obtiveram a menor aceitação quando comparados aos demais tratamentos.

Também foi verificada diferença estatística significativa entre os tratamentos com adição de 1,0% e 2% de extrato de própolis para o atributo sabor, apesar da diferença o

tratamento com 2% de extrato de própolis não diferiu estatisticamente do tratamento com 0,5% e do tratamento controle, obtendo notas referentes ao “gostei moderadamente” na escala hedônica. Para este mesmo atributo Bernardi (2010), apresentou uma menor aceitabilidade para os salames adicionados extrato de própolis livre e com microcápsulas de própolis quando comparados aos demais tratamentos, indicando sabor não característico com residual forte, pouco agradável e onde os provadores evidenciaram a presença da própolis nas amostras.

Quanto ao índice de aceitabilidade (Tabela 11) das lingüiças avaliadas sensorialmente o tratamento com 2% de extrato de própolis apresentou maior aceitação para o atributo cor com 81,33%, seguido do tratamento controle (80,22%). Porém para os atributos odor e sabor o índice de aceitabilidade para o tratamento com 2% de extrato de própolis foi o menor, apresentando valores de 67,11% e 68,67% respectivamente quando comparados aos demais tratamentos. O tratamento adicionado de 1% de extrato de própolis apresentou maior aceitação para o atributo textura (82,22%) e o tratamento controle com 80,67% para o atributo aparência global. Entretanto todos os tratamentos apresentaram índices de aceitabilidade superiores a 70% em todos os atributos avaliados. Segundo Dutcosky (1996) a repercussão é favorável quando o índice de aceitabilidade for $\geq 70\%$, sendo assim pode-se afirmar que a aplicação do extrato de própolis nas diferentes concentrações não interferiu na aceitabilidade dos atributos avaliados.

Uma das grandes preocupações de diversos autores ao desenvolver um novo produto é verificar a intenção de compra pelo consumidor (SANTANA et al., 2006; BISPO et al., 2004). Os resultados do teste de intenção de compra evidenciaram que a lingüiça adicionada de 0,5% de extrato de própolis apresentou maior intenção de compra 34% equivalendo ao termo certamente compraria na escala, seguida da lingüiça controle (30%), da lingüiça com 1% de extrato de própolis (22%) e da lingüiça com 2% de extrato (14%). Resultados superiores a este estudo foram apresentados por Bernardi e Roman (2011) que encontraram 79% dos participantes comprariam lingüiça toscana com redução do teor de sódio e 19% provavelmente comprariam o produto se este estivesse à venda.

6. CONCLUSÕES

A extração assistida por microondas focalizada demonstrou ser uma técnica simples e eficiente na extração de compostos fenólicos da própolis, pois diminuiu o tempo e aumentou a eficiência da extração.

O extrato de própolis obtido pelo micro-ondas focalizada no tempo de 20 minutos na temperatura de 70°C, apresentou o maior conteúdo de fenólicos totais (162,39mg/g) e o melhor potencial antioxidante.

Os resultados obtidos para composição centesimal das lingüiças adicionadas de extrato de própolis (0,5%, 1,0% e 2,0%) e a lingüiça controle apresentaram-se de acordo com o estabelecido pelo Padrão de Identidade e Qualidade do produto.

Quanto à oxidação lipídica o extrato de própolis mostrou-se efetivo como agente inibidor da oxidação lipídica em lingüiça toscana nas concentrações estudadas, porém o tratamento adicionado de 2% de extrato de própolis apresentou o menor valor de índice de TBARS no período de 56 dias de armazenamento (0,249).

Na avaliação da cor os valores de L* aumentaram no decorrer do período de estocagem, porém os menores valores foram verificados para os tratamentos com adição de extrato de própolis quando comparados com o tratamento controle, ocasionando um produto mais escuro. Para os parâmetros de a* ocorreu uma redução da intensidade do vermelho no decorrer do tempo, ocorrendo poucas variações entre os tratamentos. Já o b* aumento com o passar do tempo em todos os tratamentos, conseqüentemente um produto mais amarelado. Os tratamentos não influenciaram significativamente C* e o ΔE .

Em relação aos valores obtidos para *Staphylococcus* coagulase positiva; *Samonella*; *Clostridium* sulfito redutor 46°C, Coliformes totais e coliformes fecais apresentaram-se dentro dos limites de tolerância estabelecidos pela Legislação brasileira para todos os tratamentos no decorrer do período de armazenamento com alterações somente no tempo final de estocagem.

Nas características sensoriais o extrato de própolis mostrou-se com grande potencial quando aplicado em lingüiça frescal. O índice de aceitabilidade para os atributos cor, textura e aparência global foram superiores a 70% para todos os tratamentos. Para sabor e odor o tratamento adicionado de 2% de extrato de própolis obteve 68,67 e 67,11 de aceitabilidade respectivamente, sendo nos outros tratamentos (0,5% e 1,0%) acima de 70%, mostrando que nestas concentrações o extrato quando aplicado no produto é bem aceito.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, J. H.; GRUN, I. V.; FERNANDO, L. N. Antioxidant properties of natural plants extract containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 32, p. 1364–1368, 2002.

ALENCAR, S. M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. 2002. 120. f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.

ALMEIDA, C de O. **Avaliação físico-química e microbiológica de lingüiça toscana porcionada e armazenada em diferentes embalagens, sob condições de estocagem similares às praticas em supermercado**. 2005. 150 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

ALVES, E. **Atividade antioxidante de extratos de própolis comercializados em Santa Maria – RS e aplicação em lingüiça toscana refrigerada**. 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Committee on microbiological methods for foods. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed. Washington: APHA, 2001. 676p.

ANDRADE, U. V. C. et al. propolis obtained by means of alkaline hydrolysis and action on *Staphylococcus aureus*. **ARS VETERINARIA**, ,v. 25, n. 3, p. 151-154, 2009.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18. ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.

ARAUJO, J. M. A. **Química de Alimentos**. 2 Ed. Editora UFV, p 416, 2001.

ARAÚJO, Y. L. F. M. **Estudo da atividade antimicrobiana de variedades de própolis da região da Foz do Rio São Francisco-Brasil**. 2009. 140 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, Aracaju-SE, 2009.

AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 181-189, 2008.

BAILEY, A. E. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. Edible oil and fat products: oils and oilseeds. New York, v.2, 1996. 403p.

BALLARD, T. S. et al. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. **Food Chem**, v. 120, n. 4, p. 1185-1192, 2010.

BANSKOTA, A. et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 239-246, 2000.

BANSKOTA, A. H.; T EZUKA, Y.; ADNYANA, I. K. Hepatoprotective and anti Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v. 8, m. 1, p.16-23, 2001.

BASTOS, D. H. et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, p. 423-432, 2007.

BERNARDI, S. **Funcionalidade de própolis livre e microencapsulada em salame tipo italiano**. 2010. 126 f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

BERNARDI, D. M.; ROMAN, J. A. Caracterização sensorial de lingüiça toscana com baixo teor de sódio e análise do consumo de carne suína e derivados na Região Oeste do Paraná. **B. CEPPA**, v. 29, n. 1, p. 32-44, 2011.

BIANCHINI, L. E.; BEDENDO, I. P. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Sci agric Piracicaba**, v. 55, n. 1, p. 149-152, 1998.

BIRZELE, B.; DJORDJEVIC, S.; KRAMER, J. A study of the role of different nitrite

concentrations on human pathogenic bacteria in fresh spreadable ham and onion sausage. **Food Control**, v.16, p.695-699, 2005.

BISPO, E. S. et al. Aproveitamento industrial de marisco na produção de lingüiça. **Revista Ciencia & Tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 66-668, 2004.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Química do Processamento de Alimentos. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001.

BOYANOVA, L. et al. Activity of Bulgarian propolis against 94 Helicobacter pylori strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 481-483, 2005.

BORGES, C. H. F.; ALMEIDA, D. A.; FRAGIORGE, E. J. Atividade antibacteriana e antifúngica de diferentes concentrações de extratos hidroalcoólicos de própolis (EHP) em lingüiça frescal suína. **Fazu em Revista**, v. 3, n. 6, p. 53-82, 2009.

BOSIO, K. et al. In vitro activity of propolis against Streptococcus pyogenes. **Revista Letters in applied Microbiology**, v.31, p. 174-177, 2000.

BRAFORD, D. D. et al. Potassium lactate effects on low-fat fresh pork sausage chubs during simulated retail distribution. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 6, p. 1245-1248, 1993.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Instrução Normativa nº 4 de 31 de mar.2000 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. **Diário Oficial**, Brasília, 05 abr. 2000, Seção 1, p.6-10.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2003.

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

BURDOCK, G. A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.

BUSATTA, C. **Caracterização química e atividade antimicrobiana in vitro em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**. 2010, 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada, Erechim, 2010.

CABRAL, I. S. R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

CAMEL, V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. **Trends Anal. Chem.**, v. 19, n. 4, p. 229-247, 2000.

CARVALHO, J. C. T. et al. **Compostos fenólicos simples e heterosídeos**. **Farmacognosia, Florianópolis**, 3. Ed, 443-457p, 2001.

CASTAGNA, S. M. F. et al. Prevalência de suínos portadores de Salmonella sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 32, n. 2, p. 141-147, 2004.

CASTERA-ROSSIGNOL, A.; BOSQUE, F. Nouvelle approche des antioxydants. **OCL**, v. 131, n. 1, p. 131-143, 1994.

CASTRO, M. L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CHAILLOU, L. L.; NAZARENO, M. A. Bioactivity of própolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. **Food Science and Technology**, v. 42, n. 8, p. 1422-1427, 2009.

CHEN, C. N. et al. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese Propolis. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 4, p. 503-506, 2003.

CIRIANO, M. G. I. et al. Use of natural antioxidants from lyophilized water extracts of *Borago officinalis* in dry fermented sausages enriched in ω -3 PUFA. **Meat Science**, v. 83, n. 2, p. 271-277, 2009.

COLTRO, L.; BURATIN, A. E. Garrafas de PET para óleo comestível – avaliação da barreira à luz. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n. 3, p. 206 – 211, 2004.

COSTA, L. M. et al. Planejamento fatorial aplicado à digestão de amostras de feijão assistida por radiação micro-ondas. **Química Nova**, v. 29, n.1, p. 149 – 152, 2006.

CRAVOTO, G. et al. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 15, p. 899-902, 2008.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre:Artmed, 2010. 900p.

DAUGSCH, A. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas**. 2007. 144. F. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

DIAGNE, R. G.; FOSTER, G. D.;KHAN, S. U. Comparison of Soxhlet and microwave-assisted extraction for the determination of fenitrothion residues in beans. **J. Agric. Food Chem**, v. 50, p.3204-3207, 2002.

DORMAN, H. J. et al. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 16, p.4563-4569, 2003.

DURAN, R. M.; PADILLA, R. B. Actividad antioxidante de los compuestos fenolicos. **Grasas y Aceites**,v. 44, n. , p. 101-106, 1993.

DUTCOSKY, S.D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: DA Champagnat, 1996. 123p.

ESKILSSON, C. S.; BJORKLUND, E. Analytical-scale microwaveassisted extraction. **J. Chromatogr**, v. 1, n. 90, p. 227-250, 2000.

FALQUI-CAO, C. et al. Focused microwave assistance for extracting some pesticide residues from strawberries into water before their determination by SPME/ HPLC/DAD. **J. Agric. Food Chem**. v. 49, p. 5092-5097, 2001.

FERNANDES J. R. A. et al. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, n. 2, p. 1-9, 2001.

FERNANDÉZ-GINÉS, J. M. et al. Meat products as functional foods: a review. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 2, p. 37-43, 2005.

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n.1, p. 294-297, 2006.

FIGUEIREDO, P. S. F; 29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, São Paulo – SP, 2006.

FRANCO, B, LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 29.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de Própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

FURTADO, A. S. et al. Atividade antioxidante do extrato de *Achyrocline satureioides* (Marcela) em lingüiça. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19., 2004, RECIFE. **Anais...** Recife, 2004.

GARCÍA-ESTEBAN, M.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Comparison of modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period storage of dry-cured ham: effects on colour, texture and microbiological quality. **Meat Science**, v. 67, n. 1, p. 57-63, 2004.

GEBARA, E. C. E.; LIMA, L. A.; MAYER, M. P. A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 365-369, 2002.

GEORGANTELIS, D. et al. Effect of Rosemary extract, chitosan and alfa-tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. **Meat Science**, v. 76, n. 1, p. 172-181, 2007.

GOMEZ, N. E., WITTE, L. A Simple method to extract essential oils from tissue samples by using microwave radiation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 11, p. 2351–2359, 2001.

GONÇALVES, J. Princípios tecnológicos aplicados ao processamento de embutidos carneos. **Boletim do Centro de Tecnologia da Carne do ITAL**, v. 13, n. 1, p. 6-8, 2003.

GRÜN, I. U. et al. Reducing oxidation of meat. **Food Technology**, v. 60, n. 1, p. 36-43. 2006.

HAYACIBARA, M. et al. *In vitro* and *in vivo* effects of isolated fractions of Brazilian própolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 3, p. 371-376, 2005.

Hayat, K. et al. Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. **Separation and Purification Technology**, v. 70, n. 1, 63–70, 2009.

HAYES, J. E. et al. Evaluation of the effects of selected plant-derived nutraceuticals on the quality and shelf life stability of raw and cooked pork sausages. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 164-172, 2011.

HAN, S. K.; PARK, H. K. Accumulation of thiobarbituric acid-reactive substances in cured pork sausages treated with própolis extract. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 13, p. 1487-1489, 2002.

HOFFMANN, R. S. **Antioxidante natural na proteção da carne mecanicamente separada (CMS) de frango**. 2003. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

HUNT, M. C. et al. Guidelines for Meat Color Evaluation. In: 44TH ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, (pp.3-17), 9-12 July 1991. **Proceedings...** Manhattan, KS: Kansas State University. 1991.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed.; 1.ed digital, São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2008. cap. 6. p. 279-320.

ISLA, M. I. et al. Antioxidant activity of Argentine própolis extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 2, p. 165-170, 2001.

JEFFERY, G. H. et al. (revisores). **Vogel – Análise química quantitativa**. 5. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 1992.

- JIN, S. K. et al. The development of sausage including meat from spent laying hen surimi. **Poultry Science**, v. 86, n. 12, p. 2676–2684, 2007.
- KARACABEY, E. et al. Modeling solid–liquid extraction kinetics of trans-resveratrol and trans-e-viniferin from grape cane, **Journal of Food Process Engineering**, p.1-10, 2011.
- KARTAL, M.; KAYA, S.; KURUCU, S. CG-MS Analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. **Z. Naturforsch**, v. 57,n. 9, p. 905-909, 2002.
- KEREM, Z.; GERMAN-SHASHOUA, H.; YARDEN, O. Microwave-assisted extraction of bioactive saponins from chickpea *Cicer arietinum* L. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 3, p. 406–412, 2005.
- KOO, M. H.; PARK, Y. K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 367-369, 1997.
- KORNILOVA, O.; ROSELL-MELE, A. Application of microwaveassisted extraction to the analysis of biomarker climate proxies in marine sediments. **Org. Geochem**, v. 34, p. 1517-1523, 2003.
- KOSALEC, I. et al. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. **Acta Pharmacol**, v.55, p. 423-430, 2005.
- KWON, J. H.; BÉLANGER, J. M. R.; PARÉ, J. R. J. Optimization of microwave assisted extraction (MAP) for ginseng components by response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 1807–1810, 2003.
- KUMAR, N. et al. CG-MS - Analysis of propolis of Indian origin. **J. Young pharm**, v. 01, p. 46-48, 2010.
- KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 8, p. 329-339, 2004.
- LEE, Y. et al. Isolation and purification of 3,5- difrenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepilin C) and Brazilian propolis by supercritical fluid extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 54, p. 10-138, 2007.

LEINSTNER, L. Review: basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal Of food microbiology**, v. 55, p. 181-186, 2000.

MADSEN, H. L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science and Tchnology**, v. 6, n.8, p. 271-277, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 23, n. 2, p. 83-99, 1995.

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

MARIUTTI, L. R. B. et al. Effect of sage and garlic on lipid oxidation in high-pressure processed chicken meat. **Eur Food Res Technol**, v. 227, n. 2, p. 337– 44, 2008

MARTINEZ-VALVERDE ,I.; PERIAGO, M. J, PROVAN, G. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). **J Sci Food Agric**, v. 82, n. 3, p. 323-330, 2002.

MATA, A. T. et al. Antioxidant and antiacetylchoalonerse activities of Five plants used as portuguese food spices. **Food Chemistry Barking**, v. 103, n. 3, p. 778-786, 2006.

MATSUDA, S. H. Propolis-health care food. **Foods and Foods Ingredients**, v. 1, n. 160, p. 64-73, 1994.

MATSUI, K. N. **Inativação das enzimas presentes na água de coco verde (*cocos nucifera* L.) por processo térmico através do microondas**. 2006. 139. f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, T. **Sensory Evaluation Techniques**. New York: CRC Press, 1987.

MENDES DA SILVA, J. F. et al. Correlation analysis between phenolic level of Brazilian própolis extracts and this antimicrobial and antioxidants activities. **Food Chemistry**, v. 99, n.3, p. 431-435, 2006.

MENDONÇA, K. et al. Concentração de etileno e tempo de exposição para desverdecimento de limão ‘siciliano’. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p.179-183, 2003.

MENEZES, H. et al. Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. **Apidologie**, v. 28, n. 2, p. 71-76, 1997.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

MILANI, L. I. G. et al. Antioxidantes e antimicrobianos naturais para carne mecanicamente separada de frango. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 4., 2001, CAMPINAS. **Anais...** Campinas, 2001. p.122.

MILANI, L. I. G. et al. Inibição natural da oxidação lipídica na carne mecanicamente separada de frango. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS, 18., 2002, PORTO ALEGRE. **Anais...** Porto Alegre, 2002.

MILANI, L. I. G. et al. Bioproteção de lingüça de frango. **Revista Ciencia & Tecnologia de alimentos**, v. 23, n. 2, p. 161-166, 2003.

MIORIN, P. L. et al. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 913-920, 2003.

MOHAMMADZADEH, S. et al. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1097-1103, 2007.

MOREIRA, L. et al. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of própolis samples of Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. 3482-3485, 2008.

MORENO, M. I. N. et al. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 109-114, 2000.

NAGAI, T. et al. Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. **Food Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 256-262, 2006.

NAKAMURA, K. L. **Variabilidade genética e métodos de extração de metilxantinas e compostos fenólicos da erva mate (*illex paraguariensis* st. Hil.)**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia aplicada à agricultura) – Universidade Paranaense, Umuarama, 2008.

NAM, K. C.; AHN, D. U. Use of antioxidants to reduce lipid oxidation and off odor volatiles of irradiated pork homogenates and patties. **Meat Science**, v. 63, n. 1, p. 1-8, 2003.

NEGERI, B. O.; FOSTER, G. D.; KHAN, S. U. Determination of chlorothalonil residues in coffee. **Toxicol. Environ. Chem**, v. 77, p. 41-47, 2000.

NEGRI, M. L. S. **secagem das folhas de Espinheira-Santa – *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. sob diferentes temperaturas e influência nos teores de polifenóis, na atividade antioxidante e nos aspectos microbiológicos.** 2007. 95.f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

OLDONI, F. A. L. **Avaliação da digestão de amostras de piche assistida por radiação de micro-ondas e determinação de metais por ICPOES.** 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Quieroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos – Alimentos de Origem Animal.** São Paulo: Artmed, 2005. P.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. P.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Revista Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

OUFNAC, D. S. et al. Extraction of antioxidants from wheat Bran using conventional solvent and microwave-assisted methods. **Cereal Chem**, v. 84, n. 2, p. 125-129, 2007.

PAN, X.; NIU, G.; LIU, H. Microwave assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. **Chem. Eng. Process**, v. 42, n. 2, p. 129-33, 2003.

PARÉ, J. R. J.; SIGOMIN, M.; LAIPOINTE, J. Microwave-assisted natural products extraction. **US patente**, v. 5, n. 2, p. 784, 1991.

PARK, Y. K. et al. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de biologia e tecnologia**, v. 38, n. 4, p. 1253-1259, 1995.

PARK, Y. K. et al. Estudo da Preparação dos Extratos de Própolis e suas Aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998.

PAULINO, F de O. **Efeito da redução de gordura e substituição parcial de sal em lingüiça suína toscana.** 2005. 110 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Processamento Tecnológica de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

PEREIRA, M. G. **Aplicação de antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de ave.** 2009. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

PEREIRA, D. A. **Extração aquosa de própolis e secagem em leito de espuma para uso em alimentos.** 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2008.

POLLONIO, M. A. R. **Estudo das propriedades funcionais das proteínas miofibrilares e oxidação lipídica de carne de frango mecanicamente desossada,** 1994. 141 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

RAHARJO, S. et al. Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid – C18 method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 11, p. 2182-2185, 1992.

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

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A de M. Avaliação da qualidade de carnes. Ed: UFV, Visçosa – MG, 599p, 2007.

SALOMÃO, K. et al. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. **Oxford Journals**, v. 54, n. 11, 2007.

SANTANA, L. R. R. et al. Perfil Sensorial de Iogurte Light, sabor pêssego. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n.1, p. 23-36, 2006.

SELF, R. **Extraction of Organic Analytes from Foods.** A Manual of Methods, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2005.

SFORCIN, J. L. et al. Seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 243-249, 2000.

SHEID, G. A. **Avaliação sensorial e físico-química de salame tipo italiano com diferentes concentrações de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*)**. 2001. 94 f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

SINGH, S. B.; FOSTER, G. D.; KHAN, S. U. Microwave-assisted extraction for the simultaneous determination of thiamethoxam, imidacloprid, and carbendazim residues in cooked vegetable samples. **J. Agric. Food Chem**, v. 52, p. 105-109, 2004.

SILVA, J. F. M. et al. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 99, n. 431, p. 431-435, 2006.

SINGH, A. et al. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from potato peels. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2218-2232, 2011.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol**, n. 299, p. 152-178, 1999.

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

SOBRINHO, T. J. S. P. et al. Otimização de metodologia analítica para doseamento de flavonóides de *Bauhinia cheilantha*. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 288-291, 2010.

SOUSA, C. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SUN, T.; TANG, J.; POWERS, J. R. Antioxidant activity and quality of asparagus affected by microwave-circulated water combination and conventional sterilization. **Food Chem**, v. 100, p. 813-819, 2007.

SUN, Y. Z. et al. Optimization of microwaveassisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanin of extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **European Food Research Technology**, v. 225, n. 3-4, p. 511-523, 2008.

TANG, S. et al. Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. **Food Research International**, v. 34, n. 8 p. 651-657, 2001

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo: Unisinos, 1998, 226 p.

TERRA, N. N.; BRUM, M. A. R. **Carne e seus derivados – técnicas de controle de qualidade**. São Paulo: Nobel, 1988. 121p.

TERRA, N. N. et al. Proteção antioxidativa e antimicrobiana da carne mecanicamente separada de frango. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., 2000, FORTALEZA. **Anais...** Fortaleza, 2000. p. 5.124. v.2.

TORRES, E.A.F.S.; OKANI, E.T. **Teste de TBA - Ranço em alimentos**. Trabalho original recebido do próprio autor. Universidade de São Paulo (USP) Faculdade de Saúde Pública - Departamento de Nutrição, p.10, 2000.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of brazilian red propolis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 3, n. 2, p. 249–254, 2006.

TRUSHEVA, B.; TRUNKOVA, D.; BANKOVA, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. **Chemistry Central Journal**, v. 13, n.1, p. 1-4, 2007.

ZANARDI, E. et al. Lipid and colour stability of Milano- type sausages: effect of packing conditions. **Meat Science**, v. 61, n. 1, p. 7-14, 2002.

WARNER, K.; NEFF, W. E.; ELLER, F. J. Enhancing quality and oxidative stability of aged fried food with g-tocopherol. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 623, 2003.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Fotos referentes ao 56º dia de armazenamento das lingüiças toscana.



Lingüiça Controle (0% EP)



Lingüiça (0,5% EP)



Lingüiça (1,0% EP)



Lingüiça (2,0% EP)

Fonte: Acervo pessoal do autor (2011)