

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIENCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS
COMERCIALIZADOS EM SANTA MARIA - RS E APLICAÇÃO EM
LINGÜIÇA TOSCANA REFRIGERADA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Elizângela Alves

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS
COMERCIALIZADOS EM SANTA MARIA - RS E APLICAÇÃO
EM LINGÜIÇA TOSCANA REFRIGERADA**

por

Elizângela Alves

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

Orientador: Prof. Ernesto Hashime Kubota, Dr.

Santa Maria, RS, Brasil

**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

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS
COMERCIALIZADOS EM SANTA MARIA - RS E APLICAÇÃO EM
LINGÜIÇA TOSCANA REFRIGERADA**

Elaborada por
Elizângela Alves

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Ernesto Hashime Kubota, Dr.
(Presidente/Orientador)

Solange Cristina da Silva Martins Hoelzel, Dr^a. (UNIFRA)

Cláudia Severo da Rosa, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 13 de novembro de 2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família,
pelo amor incondicional nas hora boas
e ruins, tornando tudo isso possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e aos meus irmãos por todo apoio, confiança e incentivo ao estudo que sempre me proporcionaram, por me motivarem a lutar sempre em minha vida por tudo que acredito, apesar das dificuldades. Essa conquista também é de vocês!

Ao prof^o Dr. Ernesto Kubota, por sua orientação e por tornar esse projeto possível, muito obrigada!

A professora Maria da Graça, por seus ensinamentos e amizade desde a graduação.

Aos amigos e colegas da Pós-Graduação que pelos conhecimentos trocados. Aos colegas do laboratório Nidal que compartilharam comigo muitas etapas desta caminhada.

Ao pessoal do Departamento de Tecnologia de Alimentos, em especial a Marialene e Moisés, pelo apoio e carinho e por sempre estarem dispostos a ajudar! Ao estagiário Gustavo pela ajuda em muitas partes importantes do projeto.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“E há os que dão sem sentir pena, nem buscar alegria e sem pensar na virtude.
Dão como num vale o mirto espalha sua fragrância no espaço.
Pelas mãos de tais pessoas Deus fala;
e através de seus olhos Ele sorri para o mundo”.

(Kahlil Gibran)

RESUMO

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

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS COMERCIALIZADOS EM SANTA MARIA - RS E APLICAÇÃO EM LINGÜIÇA TOSCANA REFRIGERADA

AUTORA: ELIZANGELA ALVES

ORIENTADOR: ERNESTO H. KUBOTA

CO-ORIENTADOR: TATIANA EMANUELI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 13 de Novembro de 2009.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar extratos de própolis comerciais e aplicá-lo em diferentes concentrações em lingüiça Toscana. A caracterização da própolis no primeiro experimento realizou-se pelas suas composições de fenólicos e flavonóides totais, por técnicas colorimétricas. Os extratos também foram caracterizados quanto a atividade antioxidante através das técnicas quelante de metal e sequestrante de radicais livre DPPH. Após os extratos serem comparados, o que obteve melhor resultado foi utilizado, no segundo experimento, nas concentrações de 0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,4% na fabricação de lingüiças que foram analisadas sob armazenamento refrigerado. As análises físico-químicas das lingüiças foram compostas por umidade, proteínas, cinzas, gordura, pH e TBARS. Os testes de aceitabilidade das lingüiças foram determinados através da análise sensorial na 1ª semana após a produção, compararam a própolis ao chá-verde como padrão a 0,03%. Foram realizados no mesmo experimento, nos dias zero, 5º, 10º, 15º, 20º e 27º dias de armazenamento, análises de pH, TBARS e crescimento microbiológico. Os aspectos microbiológicos avaliados foram maiores no dia zero: contagem total de mesofílicos e/ou psicotróficos, *Salmonella*, Coliformes, Clostrídio sulfito redutores e *Staphylococcus aureus*; nos demais dias de análises apenas ocorreu a contagem total de mesofílicos e/ou psicotróficos. Os parâmetros físico-químicos dos extratos de própolis estavam todos de acordo com os padrões exigidos nas normas de segurança. Com relação às características sensoriais, as lingüiças Toscanas foram aceitas quanto ao gosto e aparência e o uso da própolis diminuiu a oxidação lipídica e o crescimento de microrganismos, promovendo a qualidade durante os dias de armazenamento.

Palavras-chaves: extrato de própolis; atividade antioxidante; lingüiça Toscana; vida-de-prateleira.

ABSTRACT

Master Dissertation
Pos-Graduate Course of Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS OF PROPOLIS MARKETED IN SANTA MARIA – RS AND YOUR APPLICATION IN CHILLED TUSCANY SAUSAGES

AUTHOR: ELIZANGELA ALVES
ADVISER: ERNERTO H. KUBOTA
CO-ADVISER: TATIANA EMANUELI

Place and Date of Defense: Santa Maria, November 13th, 2009.

This study aimed to characterize commercial extracts of propolis and apply it in different concentrations in Tuscan sausage. The characterization of propolis in the first experiment was carried out by their compositions and phenolic flavonoids, by colorimetry techniques. The extracts were also characterized as the antioxidant activity through the techniques of metal chelating and sequestering DPPH free radical. After the extracts were compared, which showed the best result was used in the second experiment, the concentrations of 0.1%, 0.2%, 0.3% and 0.4% in the manufacture of sausages, which were analyzed under cold storage. The physico-chemical properties of the sausages were made up of moisture, protein, ash, fat, pH and TBARS. The acceptability of these tests was determined with sensory analysis within 1 week after production, propolis compared to green tea as the standard 0.03%. Were performed the same experiment, on days zero, 5, 10, 15, 20 and 27 days of storage, analysis of pH, TBARS and microbiological growth. The microbiological aspects evaluated were higher at day zero: the total count of mesophilic and / or psychrotrophic, *Salmonella*, coliforms, sulfite reducer clostridia and *Staphylococcus aureus*, the other days of analysis was only the total count of mesophilic and / or psychrotrophic. The physicochemical parameters of the propolis extracts were all in accordance with the standards required by safety standards. With respect to sensory characteristics, the Tuscan sausages were accepted as the taste and appearance, and the use of propolis have decreased lipid oxidation and microbial growth, promoting quality during the days of storage.

Keywords: propolis; antioxidant activity; Tuscan sausage; shelf-life

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivos Gerais.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	
3.1 Própolis.....	13
3.2.1 Atividade antioxidante	14
3.1.2 Atividade antimicrobiana.....	16
3.2 Lingüiça Toscana.....	19
3.2.1 Conservação da lingüiça Toscana.....	20
3.2.2 Oxidação lipídica.....	21

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	25
4.1 Artigo 1.....	26
CONTEÚDO DE FENÓLICOS E FLAVONÓIDES TOTAIS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AMOSTRAS DE PRÓPOLIS COMERCIAIS.....	26
4.2 Artigo 2.....	37
ADIÇÃO DE EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS E EXTRATO DE CHÁ VERDE EM PÓ NA FABRICAÇÃO DE LINGÜIÇA TOSCANA	37
5 DISCUSSÃO.....	54
6 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

As abelhas *Apis mellifera* produzem além do mel outras substâncias como geléia real e própolis, que tem sido relatada como substâncias com propriedades antimicrobianas e antioxidantes. (WESTON, 2000; NAGAI et al., 2001; NAGAI & INOUE, 2004; STOCKER et al, 2005). O controle de qualidade, o valor nutricional e o monitoramento de resíduos tóxicos em alimentos têm se destacado ultimamente como os principais itens de interesse público (IBANEZ & CIFUENTES, 2000).

Também o interesse por alimentos funcionais tem crescido recentemente, ou seja, aqueles alimentos que fornecem não só o valor energético e nutricional, mas também algum benefício fisiológico (Goldberg, 1996 citado por GOMEZ-CARAVACA et al., 2006) e a funcionalidade de um alimento está relacionada a alguns ingredientes que o mesmo contém, sendo que atualmente os consumidores estão dando preferência àqueles ingredientes que tenham origem natural, que são normalmente extraídos de plantas, sub-produtos alimentícios e outras fontes naturais, do que aos sintéticos (Herrero et al, 2005 citado por GOMES-CARAVACA et al., 2006).

Ao lado da deterioração microbiológica, a oxidação lipídica é um dos principais processos que levam à perda de qualidade dos produtos cárneos (BUCKLEY, MORRISSEY, & GRAY, 1995). A oxidação lipídica de produtos cárneos inicia na fração fosfolipídica altamente insaturada nas membranas subcelulares (GRAY & PEARSON, 1987).

A própolis é uma substância resinosa coletada por abelhas melíferas dos botões florais e folhas de árvores e plantas, misturadas com o pólen bem como enzimas secretadas pelas abelhas. É usada pelas abelhas como material para selar aberturas e eliminar invasores de colméias (CRANE, 1997).

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 no Brasil.

Kamagawa et al. (2004) estudando própolis de diferentes regiões geográficas encontraram que a atividade antioxidante dos mesmos apresentava correlação com o conteúdo total de flavonóides no extrato etanólico de própolis. Os fenólicos são

considerados como antioxidantes mais abundantes e efetivos na própolis (SCHELLER, WILCZOK & IMILSKI, 1990).

Han & Park (2002) estudando o efeito de diferentes extratos de própolis encontraram uma diminuição acentuada de TBARS em amostras de embutidos curados de carne suína em comparação com as amostras controle e tratada com sorbato.

Atualmente, várias substâncias naturais têm sido estudadas para o uso como ingredientes e suplementos para os consumidores em vários países, estando os produtos oriundos da abelha *Apis mellífera* incluídos nesta relação em função da ampla atividade biológica que os mesmos apresentam.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais:

- Caracterizar seis extratos de própolis comercializados em Santa Maria, RS quanto à composição de fenólicos e flavonóides para correlacionar com a ação antioxidante e aplicar o extrato na fabricação de lingüiça Toscana.

2.2 Objetivos Específicos:

- Analisar seis extratos de própolis comerciais quanto ao conteúdo de flavonóides e fenólicos totais e quanto à atividade antioxidante pelo método quelante e pelo seqüestro de radical DPPH;
- Avaliar a ação antioxidante de própolis nas concentrações 0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,4% em lingüiça Toscana, utilizando como controle positivo o chá-verde;
- Determinar a composição físico-química das lingüiças Toscanas;
- Avaliar alterações microbiológicas, pH e de oxidação lipídica durante armazenamento refrigerado;
- Avaliar sensorialmente a aceitabilidade da lingüiça Toscana nos diferentes tratamentos;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Própolis

A própolis é uma substância resinosa coletada por abelhas melíferas dos botões florais e folhas de árvores e plantas, misturadas com o pólen bem como enzimas secretadas pelas abelhas. É usada pelas abelhas como material para selar aberturas e eliminar invasores de colméias (CRANE, 1997). A própolis possui consistência e coloração variada e sua composição irá depender da origem do material coletado, refletindo a variedade de vegetação próxima à colméia. No geral, a própolis é composta de 50% de resina e bálsamo de vegetais, 30% de cera (considerada impureza), 10% de óleos aromáticos, 5% de pólen e 5% de várias substâncias.

A classificação da própolis em 12 tipos reflete a diversidade vegetal das áreas tropicais e a própolis vermelha é o 13º tipo, devido sua cor vermelha intensa e tem demonstrado, com seu perfil químico, várias atividades biológicas em ensaios “in vitro” (SILVA et al, 2008).

Os compostos fenólicos, como os flavonóides, são responsáveis pela atividade biológica da própolis e atuam juntamente com os derivados do ácido cinâmico e seus ésteres e os diterpenos (SALATINO et al, 2005).

Segundo Bontempo (2008) desde a antiguidade esse produto foi utilizado empiricamente por civilizações com alto grau de desenvolvimento como os egípcios, maias, gregos e romanos.

Nos últimos anos foram estudadas cientificamente as suas diversas ações farmacológicas. A própolis vem sendo utilizada como preventivo de doenças em humano, inclusive a gama de produtos farmacêuticos estão crescendo (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2005).

A própolis nasal em spray com indicação para sinusite, rinite e descongestionante e o xarope de própolis para gripes, amidalites e bronquites. Em infecções de ouvido existem soluções otológicas de própolis com ação antibiótica e analgésica. Quando associada à geléia real é usada na forma de gel para massagem como analgésico e antiinflamatório para lesões e inchaços nas articulações. A pomada tem uso anti-séptico, cicatrizante, antiedemaciante, antiherpes, antifúngico candidíase e nas micoses interdigitais e radio protetora

(aplicada antes da radioterapia). Quando em enxaguatório bucal (solução hidroetanólica de própolis) previne a cárie, as gengivites, a afta e cicatriza úlceras gastroduodenais (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2005).

A própolis verde brasileira é considerada a melhor e mais eficiente do mundo. Isso porque o Brasil apresenta clima e meio-ambientes propícios para que as abelhas possam produzir essa qualidade superior de própolis (BONTEMPO, 2008).

Entre as conhecidas ações da própolis na saúde humana estão antibacteriana, antifúngica e antiinflamatória (DOBROWOLSKI, 1991), antiviral, cicatrizante (TSAKOFF, 1978), anestésica e propriedades preventivas ao câncer (GHISALBERTI, 1979).

Os subprodutos das abelhas são diversos e as aplicabilidades fitoterápicas, cosméticas e alimentares mostram isso. As diferenças do mel, da geléia real e da própolis nem sempre são sutis, pois no aquecimento a 100°C da geléia real e da própolis não se observa alterações da atividade no teste de peroxidação, diferentemente de alguns méis que perdem a atividade rapidamente. Os flavonóides presentes na própolis estão diretamente relacionados a forte atividade antioxidante. No mel os constituintes responsáveis por essa atividade são decompostos com o calor (NAGAI et al, 2001).

O uso de substâncias naturais, como a própolis, na medicina familiar desde os tempos primórdios tem atraído atenção em anos recentes como sendo um ingrediente em produtos domésticos e produtos alimentícios, uma vez que, possui várias propriedades biológicas incluindo propriedades antimicrobianas, antioxidantes e antiúlceras (BURDOCK, 1998).

3.1.1 Atividade Antioxidante

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados passando a ter função oxidante ou redutora de elétrons. São produzidos continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em vários processos bioquímicos, desempenhando funções relevantes no organismo (MOREIRA, 2004).

A produção em excesso de radicais livres pode conduzir a diversas formas de dano celular e desenvolver numerosas doenças (artrite, aterosclerose, diabetes,

catarata, esclerose múltipla, cardiopatias e câncer). Diversas vitaminas e minerais podem agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função, a atividade antioxidante pode ser praticada por substâncias encontradas em concentrações pequenas nos alimentos (MOREIRA, 2004).

Segundo Halliwell (2000), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada ao substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. Assim, o combate ao excesso de radicais livres pode ocorrer via antioxidante metabólico ou via absorção da dieta.

A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina, sendo que muitas vezes os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (HALLIWELL, 1995).

O α -tocoferol (vitamina E), β - caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos (ácido caféico, ácido gálico e ácido elágico) são antioxidantes provenientes de alimentos, tais como a uva, o morango e as nozes (HALLIWELL, 1995).

O uso de temperos é um procedimento estabilizador em alimentos para muitas culturas. Ao adicioná-los além de acrescentar flavor, muitos aditivos também possuem ação antioxidante. Os compostos fenólicos constituem a maior parte dos antioxidantes naturais conhecidos e identificados como antioxidantes nas plantas *Rosmarinus officinalis* L. e *Salvia officinalis* L. O orégano (*Origanum vulgare* L.) possui quatro flavonóides que atuam juntos com os compostos antioxidantes ativos, ou seja, os flavonóides juntos com os compostos fenólicos têm contribuído para a atividade antioxidante (RISCH, S.; CHI-TANG, H., 1996).

A atividade antioxidante do extrato etanólico e aquoso de própolis relatada por Park et al. (1998) seria conferida pela presença de flavonóides na mesma (PRATT & BIRAC, 1979).

Em estudo com extrato oleoso de própolis, a extração de compostos fenólicos foi inferior e a eficiência inferior ao extrato hidroalcoólico. Ainda assim, algumas atividades antibacterianas e citotóxicas não foram prejudicadas, levando a crer que existem outros compostos efetuando essa atividade farmacológica (BURIOL, 2009).

Nagai et al. (2001) estudando a atividade antioxidante de méis comerciais, geléia real e própolis encontraram que a atividade antioxidante dos méis comerciais diminuía com o tempo decorrido e que a atividade antioxidante da geléia real e da própolis era mantida mesmo após o tratamento térmico a 100°C. Buratti et al. (2006) correlacionou o poder antioxidante do mel e da própolis com a quantidade de fenóis.

Isla et al. (2001) investigaram a atividade antioxidante de própolis Argentino e encontraram que a correlação entre o conteúdo de fenólicos e a atividade antioxidante era significativa, porém acreditam que outros fatores podem estar envolvidos.

A própolis potencializa e estimula a liberação de enzimas superóxido dismutase e glutatona peroxidase, as quais se encarregam de bloquear a formação ou destruição dos radicais livres. Bonan e Cohen (1992), ao publicar os avanços no campo da medicina ortomolecular nas doenças degenerativas, relacionaram a atividade dos radicais livres como uma das teorias de proliferação e a própolis possui constituintes capaz de barrar a ação oxidativa destes radicais.

Os hidroperóxidos lipídicos formados durante a fase de propagação do processo de peroxidação são instáveis e são quebrados na presença de elementos traços levando a novos radicais livres e outros compostos, incluindo radicais alquilas, aldeídos, cetonas e uma grande gama de compostos carbonilados que afetam negativamente a textura, cor, flavor, valor nutritivo e a segurança dos produtos cárneos (BUCKLEY et al., 1995).

Em geral, nas carnes e nos produtos cárneos as dimensões das alterações lipídicas oxidativas são quantificadas medindo-se os produtos secundários da degradação. Dentre estes produtos secundários recebem destaque os aldeídos como o aldeído malônico, 4-hidroxinonenal e a acroleína, que se relacionam à várias doenças - aterosclerose, diabetes, mutagênese e até câncer (MEDEIROS et al., 1996).

3.1.2 Atividade Antimicrobiana

Os antimicrobianos são substâncias que tem a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos. Na medicina quando se conhece a doença, como a meningococemia, os fármacos escolhidos são drogas de menor espectro e maior

potência para não desenvolver resistência e reincidência da doença. Nos casos de sepse grave, sem definição etiológica, deve-se ampliar o espectro, procurando atingir os microorganismos mais prováveis (PARADISI, 2002).

A grande diversidade de plantas medicinais utilizadas no Brasil como uma forma alternativa no tratamento de doenças estimula o estudo para isolamento de seus princípios ativos, pois o medicamento industrializado é de custo mais alto. Essas plantas possuem comprovada atividade antibacteriana e antifúngica, resultado de compostos do metabolismo secundário (terpenóides) e compostos fenólicos (HULIN, 1998).

Em alimentos, segundo Cabral (2008), a atividade antibacteriana é realizada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), técnicas que possuem controle positivo e negativo e avaliam substâncias com potencial antimicrobiano conforme a mudança de cor nas microplacas com reagentes específicos para cada microorganismo analisado.

A propriedade antimicrobiana de própolis tem sido largamente relatada. Nagai et al. (2006), explica que a própolis apresenta um efeito inibitório elevado contra o crescimento microbiano durante a conservação da carne e músculo. Lee et al. (2005), que o extrato etanólico de própolis apresenta ação antimicrobiana contra o *Staphylococcus aureus*.

Já Miorin et al. (2003) mostraram que tanto o mel quanto a própolis oriundas de *A. melífera* e *T. angustula* apresentam ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, salientando que as amostras de mel apresentam atividade mais baixa quando comparada com a própolis.

Demonstrou-se que a atividade antibacteriana dos extratos de própolis deve ser avaliado estabelecendo a Mínima Concentração Inibitória (CIM) e a Mínima Concentração Bactericida (CBM) em relação a cepa ATCC de *Staphylococcus aureus*. Observou-se ademais que é de grande importância a relação CIM:CBM. Quanto mais próxima seja a relação 1:1 mais útil é o extrato para propósitos terapêuticos. A atividade antimicrobiana dos extratos de própolis inclui a atividade antibacteriana, antiviral e antimicótica. Comprova-se com estudos “in vitro” e “in vivo” esta ampla atividade da própolis.

Em 1996, Valdés estudou a atividade antimicrobiana de duas amostras de própolis procedentes do Chile, mediante a determinação da CIM e CBM frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomona aeruginosa* em

concentração bacteriana de 10^3 e 10^9 células/mL, e comprovou a atividade antibacteriana frente aos microrganismos provados, para resultar os valores de CIM e CBM menores para *Staphylococcus aureus*, de onde se evidenciou um maior efeito antibacteriano.

Sabe-se inclusive que os extratos da região Sul são ricos em flavonóides, por isso a sua alta atividade. A origem das flavononas se encontra nos exsudados vegetais, e unidas as flavonas se consideram como elemento de elevada atividade biológica, com mais de quarenta funções terapêuticas reconhecidas, entre elas: antibacterianas, antiparasitária, antimicótica, cicatrizante, antioxidante, protetora dos vasos capilares, antivirótica, imunomoduladora e radio protetora (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2005).

Um antigo estudo detalhado de Papay et al. (1985) mediram a atividade antibacteriana das frações e os compostos isolados da Própolis húngara e as resinas de álamo frente a germes Gram positivos (*Staphylococcus albus*, *St. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*, *Micrococcus sp.* e *Sarcina lútea*) e Gram negativos (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* e *Shigella flexneri*), demonstrando efeito antibacteriano fundamentalmente a pinocembrina, isalpina e galangina. No entanto, na fração lipóide da própolis e das resinas de álamo ressaltou-se uma atividade mais forte na mesma concentração.

Os compostos químicos responsáveis pela atividade antibacteriana são de natureza química distinta dos responsáveis pela atividade antioxidante, ou seja, não há o efeito sinérgico quando se compara uma fração do extrato de própolis vermelha e o extrato puro (CABRAL, 2009).

Giral et al. (1996), em seus estudos sobre a atividade de um extrato de própolis, procedente da província de Pinar Del Rio, Cuba, frente a diferentes cepas virais DNA (Herpes Simples tipo-1) e RNA (Vírus Influenza) A e B e vírus da dengue (tipo – 2) determinaram que o extrato aquoso de própolis testado, demonstrou atividade viricida sobre todos os vírus investigados, resultando seu efeito na dependência da concentração e o tempo de contato.

3.2 Lingüiça Toscana

Uma das maneiras de conservar a carne é a produção de lingüiças, desde a mais longínqua antiguidade. Há registros na história do consumo de lingüiças entre os babilônios e chineses já por volta de 1500 a.C. Durante a Idade Média já existia uma grande variedade de lingüiças, nomeadas conforme a região de origem. A lingüiça Toscana, por exemplo, foi desenvolvida em Toscana na Itália e seus imigrantes trouxeram a receita para o Brasil, sendo um embutido frescal com ingredientes naturais e com curta vida de prateleira.

Na Itália é conhecida por “Salsiccia Toscana”, uma das mais apreciadas lingüiças, porém, como muitos outros produtos de famílias de pequenos agricultores, a “Salsiccia Toscana” precisou agregar a inevitável evolução tecnológica para satisfazer aos requerimentos de segurança. A adição de temperos é indispensável para o flavor e compensar a ausência de metabólitos antimicrobianos, entre outros produtos que caracterizam as lingüiças fermentadas (SALGADO; FRANCO, 2005).

A lingüiça Toscana é muito conhecida e popular entre os produtos cárneos da Grécia. Nas principais famílias rurais do país a produção ocorria após o Natal, mas atualmente a receita é manipulada durante todo ano e tem sofrido muitas variações (GEORGANTELIS et al, 2007).

Feita exclusivamente de carne suína, é uma lingüiça crua e curada. A carne é moída em pedaços menores que os da lingüiça calabresa (origem Calábria, Itália). Entra em seu preparo toucinho e, em alguns casos, erva-doce, o que a deixa perfumada. Esta carne é muito suscetível à oxidação por possuir uma alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados (WEBER; ANTIPATIS, 2001). Isto favorece a busca por alimentos seguros e funcionais nas indústrias alimentícias que procuram cada vez mais investir em novas tecnologias e sistemas que os venham a garantir e evite a responsabilidade por alguma toxi-infecção quando ingeridos pela população (SECO et al, 2004).

No Brasil, lingüiça frescal é um dos produtos cárneos mais consumidos. A falta de tratamento térmico torna esta lingüiça propensa a oxidação lipídica e contaminação microbiana. Uma das alternativas para conservação é a refrigeração empregando-se, geralmente, a temperatura de 2 a 4°C. Porém, na prática a durabilidade dos produtos refrigerados não é muito extensa, chegando ao máximo

20 dias quando possui aditivos, condimentos esterilizados e com boas práticas de fabricação (PRANDL et al, 1994).

A qualidade de um produto cárneo é definida pela formulação. Após definir os componentes precisam-se saber informações sobre as propriedades e a composição da matéria-prima presente no alimento. Segundo Almeida (2005) a formulação deve seguir a legislação, ter qualidade organoléptica e estabilidade microbiológica, além de custar um valor compatível a sua comercialização. Ao basear-se em informações precisas sobre a composição das matérias-primas a formulação e o processamento tornam-se relativamente simples. As principais etapas no processamento da lingüiça são: Recebimento da matéria-prima; Preparo e formulação; Moagem; Homogeneização das carnes com os condimentos e aditivos, desenvolvimento do sabor e início do processo de cura; Embutimento.

3.2.1 Conservação da lingüiça Toscana

A carne suína, matéria-prima principal da lingüiça Toscana, quando testada com conservantes naturais como o alecrim, sálvia, manjericão e gengibre obtiveram resultados positivos quanto à manutenção da cor e a estabilidade lipídica (MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. ,2007).

O aumento da vida-útil de produtos cárneos enfrenta como empecilho a perda de qualidade global. Sendo que este termo abrange vários fatores como atributos adequados quanto a composição química, estrutura morfológica, propriedades físicas e químicas, aspectos bioquímicos, contaminação microbiana, propriedades tecnológicas e culinárias, padrões higiênicos. A qualidade é determinada por diversos parâmetros que se resumem em: características físicas, químicas, nutricionais, organolépticas e microbiológicas (PELOSO, 1999).

Segundo Kamdem et al (2007), os marcadores de microrganismos, como ácido acético, benzaldeído, acetona, foram encontrados em quantidades significativamente diferente em amostras controle, adicionadas de sais nitrato e nitrito, mas não em amostras com temperos, ou seja, o uso de ingredientes

adicionais permite uma redução na concentração de nitritos e nitratos da formulação da lingüiça frescal, sem alteração na cor e microbiologia do produto.

A alimentação humana carece de soluções práticas para a produção de alimentos com mais constituintes saudáveis. Produtos cárneos livres de aditivos químicos e cocção são vistos como perecíveis, ou seja, necessita ingestão quase que imediata. A perecibilidade poderia ser restringida adicionando ingredientes naturais ao produto padrão, mantendo - se a aceitabilidade deste.

O uso de produtos químicos para preservar os alimentos não vem ao encontro da redução dos aditivos químicos e seus resíduos. A aplicação de mel como antioxidante e antibacteriano na degradação da carne tem obtido resultados positivos e a própolis teve resultados de forte inibição de crescimento bacteriano, chegando a inibir totalmente o crescimento em alguns tipos de carne (NAGAI et al, 2006).

3.2.2 Oxidação Lipídica

Ao lado da deterioração microbiológica, a oxidação lipídica é um dos principais processos que levam à perda de qualidade dos produtos cárneos. A rancidez oxidativa ocasionada pela oxidação de ácidos graxos poliinsaturados é a principal causa deste tipo de deterioração em carnes (ARAÚJO, 1999).

A oxidação do colesterol presente nas carnes é outro fator importante no processo de rancidez oxidativa das carnes por formar produtos aterogênicos, mutagênicos e carcinogênicos (KUMAR; SINGHAL, 1991).

O processo de oxidação começa imediatamente após o abate, sendo favorecido pela presença de agente pró-oxidantes (luz, mioglobina, citocromo, metais de transição) e exposição ao ar atmosférico (MACHADO, 1994; BUKLEY et al., 1995).

A oxidação lipídica é uma das causas da deterioração de alimentos cárneos, levando a muitos efeitos adversos sob as características de qualidade, dentre elas: sabor, aroma, textura e valor nutritivo influenciando a decisão de compra pelos consumidores e podendo colocar em risco a segurança desses alimentos (TERRA, 1998).

Os produtos da oxidação lipídica são cetonas, aldeídos, alcoóis, ácidos e hidrocarbonetos, responsáveis pelo odor e gosto de ranço. Sendo assim, embora os lipídios confirmem características desejáveis em um produto (suculência, sabor, aroma, valor nutricional e propriedades tecnológicas), eles podem acelerar a perda da qualidade e da vida útil do produto (TERRA, 1998).

Um produto oxidado ao ser ingerido pode causar modificações patológicas na mucosa intestinal, atividade inibitória de enzimas e aumento no teor de colesterol e peróxidos no soro sanguíneo, ou seja, provoca doenças como a aterosclerose (KARPINSKA, BOROWSKY e DANOWSKAOZIEWICZ, 2001).

A oxidação lipídica, como um processo autocatalítico, tem os produtos das reações iniciais propagando-se em cadeia, nos estágios: iniciação, propagação e terminação. Na fase de iniciação, o ácido graxo insaturado forma um radical livre, através da abstração de um átomo de hidrogênio de sua molécula, que reage rapidamente com o oxigênio triplete formando um radical peróxido. A fase de propagação envolve a continuação e a aceleração desta reação em cadeia. A terminação é o estágio onde os radicais livres começam a reagir entre si formando espécies não-radicais estáveis. A oxidação pode ocorrer também na presença de oxigênio singlete, onde o ácido graxo insaturado irá formar um hidroperóxido pela introdução direta de um oxigênio singlete em um dos carbonos da ligação dupla do ácido graxo. (COULTATE, 2002).

A alteração da cor também é um indicativo da oxidação lipídica, e as diversas cores foram analisadas por Lawrie et al (1998), totalizando em pelo menos 12 cores relacionadas a valência do átomo de ferro da molécula de mioglobina. Algumas mudanças são desejáveis, como a reação nitratos/nitritos de salsichas e outras indesejáveis como o esverdeamento de lingüiças.

A existência de uma interdependência entre a oxidação lipídica e a da cor sustentada por muitos autores, é explicada pela presença dos radicais livres produzidos durante a oxidação lipídica que podem oxidar o átomo de ferro ou desnaturar a molécula de mioglobina, alterando negativamente a cor dos produtos (TERRA, 1998).

Segundo BRASIL (1998), durante o processamento, a adição de antioxidantes é regulamentada pela legislação e podem ser da classe antioxidante primário (inibem radical livre) e/ou secundária (quelante de metais catalíticos).

As pesquisas atuais propõem o isolamento de compostos fenólicos presentes em sementes, frutas, folhas e raízes, visando reaproveitamento como antioxidante e diminuição do impacto ambiental das indústrias. Os ácidos fenólicos, os flavonóides e os taninos são os principais compostos fenólicos encontrados em fontes vegetais (BALASUNDRAN et al., 2006).

Ao testar os extratos de sementes de manga (*Mangifera indica* L.) e maracujá (*Passiflora* sp.) embora apresentassem maiores teores de fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) que as de pêssigo (*Prunus persica*), todos os extratos apresentaram proteção semelhante contra a peroxidação lipídica “in vitro” em homogeneizado de peixe (BOCHI, 2007).

No caso das lingüiças, o início da reação de rancidez oxidativa é catalisado pela ação do oxigênio do ar sobre os ácidos graxos insaturados presentes na gordura suína. A autoxidação lipídica é iniciada pela formação de radicais livres, os quais atacam e abstraem um átomo de hidrogênio de um radical metil, adjacente a dupla ligação do ácido graxo insaturado, deixando um elétron desemparelhado no carbono, gerando um radical alila (KAHL e HILDEBRANDT, 1986).

A oxidação que leva a rancidez oxidativa é determinada pelo índice de TBARS são expressos em valores de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), que se mostra um bom indicador do grau de deterioração e de alterações organolépticas (CRACKEL et al., 1988).

Segundo Lyon et al. (1988), o TBARS em carnes de frango obteve correlações significativas com atributos sensoriais típicos do alimento. Outros estudos também foram conduzidos usando os valores de TBARS como indicador do processo de oxidação de carnes e derivados, portanto, a informação do número de TBARS é bastante relevante (AHH et al., 1998; HORAX et al., 1999; JO et al., 1999).

Processos envolvidos na elaboração de produtos cárneos que incluem moagem, mistura e cozimento favorecem a formação do malonaldeído, sendo fundamental o emprego do teste na avaliação da qualidade do produto final (OSAWA, FELICIO e GONCALVES, 2005).

Na determinação da oxidação lipídica pelo teste de TBARS, todas as análises devem ser feitas através de um único meio de extração. Assim, a mudança dos valores de TBARS para uma situação particular ou um determinado tipo de produto cárneo pode mostrar o comportamento da oxidação dos lipídios que ocorre durante o processamento e/ou armazenamento. Dessa maneira, pode-se, por exemplo,

avaliar a eficácia de antioxidantes de diferentes fontes ou de diferentes embalagens, na estabilidade de um dado produto (RHEE, 1989; RAHARJO e SOFOS, 1993).

A estabilidade oxidativa dos alimentos é dependente do equilíbrio entre a composição e concentração do substrato e a presença de pró - oxidantes. A remoção do oxigênio, inativação de enzimas, proteção contra luz e íons metálicos são importantes para evitar ou minimizar a oxidação lipídica. No entanto, todas estas medidas nem sempre são aplicáveis. A adição de antioxidantes constitui pratica mais comum para aumentar a estabilidade dos lipídios. Portanto, a prevenção destas reações poderá minimizar os seus efeitos adversos, e aumentar a vida-de-prateleira (shelf-life) dos alimentos (KRING e BERGER, 2001).

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS:

4.1 Artigo 1

CONTEÚDO DE FENÓLICOS E FLAVONÓIDES TOTAIS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AMOSTRAS DE PRÓPOLIS COMERCIAIS¹

Elizângela ALVES²

Em fase de revisão pelo autor para ser submetido à Revista Química Nova

¹ Manuscrito recebido em

² Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CCR, UFSM. Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

*Email: elizangela.farma@gmail.com

* A quem a correspondência deve ser enviada.

1º Artigo

CONTEÚDO DE FENÓLICOS E FLAVONÓIDES TOTAIS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AMOSTRAS DE PRÓPOLIS COMERCIAIS

Elizangela Alves.

Resumo

Este trabalho determinou algumas características físico-químicas de própolis de Santa Maria - RS. As amostras foram obtidas de farmácias e lojas de produtos naturais. A composição química quanto as fenólicos e flavonóides totais, assim como a atividade antioxidante foram testados e comparados. Os extratos puros (diluídos quando necessário) através dos flavonóides e fenólicos totais explicaram a alta atividade antioxidante, confirmando a relação destes compostos na ação preventiva contra os radicais livres. As seis amostras comerciais analisadas possuíram de fenólicos 70,60 mg a 539,10 mg de ácido gálico/g de extrato de própolis e de flavonóides 48,95 mg a 114,50 mg quercetina/g de extrato de própolis . Já a atividade antioxidante maior foi do extrato aquoso, tanto pela inibição do radical DPPH quanto pela atividade quelante. O extrato aquoso de própolis obteve resultados satisfatórios para futura aplicação em alimento.

Palavras-chave: compostos fenólicos; flavonóides; própolis; atividade antioxidante; extrato etanólico.

Summary

This study determined some physical and chemical characteristics of propolis of Santa Maria - RS. The samples were obtained from pharmacies and health food stores. The chemical composition as the phenolics and flavonoids, and antioxidant activity were tested and compared. The pure extracts (diluted when necessary) by the total phenolics and flavonoids explain the high antioxidant activity, confirming the relationship of these compounds in the preventive action against free radicals. The six samples analyzed possessed of phenol 70,60 mg a 539,10 mg gallic acid / g of propolis extract and of flavonoids 48,95 mg a 114,50 mg quercetin / g of propolis extract. The activity was higher antioxidant of the aqueous extract, both the inhibition of DPPH radical as the chelating activity. The aqueous propolis extract obtained satisfactory results for further application in food.

Keywords: phenolic compounds, flavonoids, propolis, antioxidant activity, ethanol extract.

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que as abelhas *Apis mellifera* produzem além do mel outras substâncias como geléia real e própolis, que tem sido relatada como substâncias com propriedades antimicrobianas e antioxidantes¹⁻⁴.

A própolis é uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletada pelas abelhas melíferas de ramos, flores, pólen, brotos, botões florais e exsudados de plantas; as quais as abelhas, adicionam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto final. Sendo utilizada pelas abelhas para eliminar possíveis invasores e selar aberturas na colméia^{5,6}.

O uso do extrato etanólico da própolis destaca-se pelas propriedades farmacológicas em sprays anti-sépticos bucais e nasais, assim como o uso do extrato puro no combate de gripes e resfriados. As atividades antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica, antioxidante e estimuladora do sistema imunológico vem proporcionando a aplicabilidade pela indústria farmacêutica e alimentícia, na forma de alimentos funcionais⁷.

A prevenção da oxidação lipídica é uma das buscas na indústria cárnea, já que seus produtos são indesejáveis não somente pela produção de odores e flavours ofensivos, como resultado da decomposição de lipídios e produção de compostos voláteis, mas também, pela destruição de constituintes essenciais, ocasionando o decréscimo do valor nutricional dos alimentos e a formação de compostos tóxicos durante o processamento^{8,9}.

Os antioxidantes sintéticos amplamente utilizados como o BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno), TBHQ (t-butil-hidroquinona) e PG (galato de propila), têm sido questionados ao passo que antioxidantes naturais como tocoferol, polifenóis da erva-mate e da marcela e pigmentos carotenóides das frutas tropicais tem apresentado uma grande relevância na proteção contra oxidação lipídica¹⁰.

Este trabalho terá como objetivo avaliar o teor de fenólicos e flavonóides totais e atividade antioxidante “in vitro” das amostras de extratos de própolis comercializadas em Santa Maria – RS.

2 MATERIAIS

Os extratos de própolis foram obtidos em farmácias e lojas de produtos naturais de Santa Maria, Rio Grande do Sul. Foram identificadas pelas letras A, B, C, D, E, os extratos etanólicos, e F, o extrato aquoso. A concentração de extrato seco de todas as amostras foi de 11,0%, exceto a B que foi de 12,0%.

Os reagentes líquidos (Folin Ciocalteu, (\pm) - α - Tocoferol e álcool metílico) e os sólidos (carbonato de sódio anidro, ácido gálico, cloreto de alumínio, quercetina, DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) utilizados foram da Sigma Chemical Co, Merck e Synth. As soluções foram preparadas com os solventes adequados visando minimizar a contaminação das análises.

2.1 MÉTODOS

O conteúdo de fenólicos e flavonóides totais dos produtos de abelha *Apis mellífera* foi determinado conforme as metodologias descritas a seguir.

2.1.1. Conteúdos de fenólicos totais

Para a determinação de fenólicos totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu^{11,12}. As amostras (0,5ml) foram diluídas para 50 mL com água destilada e filtradas em papel de filtro Wathman nº1. Esta solução (0,5 mL) foi então misturada com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2N por 5 minutos e por fim adicionou-se 2 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). Após a incubação à temperatura ambiente no escuro por 2 horas, a absorbância foi medida a 760nm contra o branco que se consistiu de metanol e comparada com a curva padrão de ácido gálico em quatro pontos de concentrações (2, 4, 6 e 8 $\mu\text{g/ml}$). $Y=0,0685x - 0,078$, onde y é a absorbância e x é a concentração; $R^2 = 0,9996$. O conteúdo total de fenólicos foi expresso em mg equivalente de ácido gálico por grama de extrato de própolis, considerando o teor de extrato seco das mesmas.

2.1.2. Conteúdo de flavonóides totais

O conteúdo total de flavonóides foi determinado usando o método de Dowd adaptado¹³. Resumidamente, 500 µL de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 2% em metanol foi misturada com o mesmo volume da solução de amostra (100µl de extrato para 50 ml de água destilada). Quanto a absorvância, leu-se 415 nm após 10 minutos contra um branco consistindo de uma solução de 500 µL de metanol com 500 µL de cloreto de alumínio. O conteúdo total de flavonóides foi determinado usando uma curva padrão de quercetina em quatro pontos de concentrações (5, 10, 20 e 40 µg/ml). $Y=0,0063x - 0,0048$, onde y é a absorvância e x é a concentração; $R^2 = 0,9999$ O conteúdo total de flavonóides foi expresso como mg de equivalente de quercetina por grama de extrato de própolis, considerando o teor de extrato seco das mesmas.

2.2. Atividade antioxidante

2.2.1. Capacidade de seqüestro de radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A medida da capacidade sequestrante foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand - Willians, Cuvelier e Berset¹⁴. Preparou-se solução 0,1mM de DPPH em etanol e 1,0 mL desta solução foi adicionada à 250 µl das amostras.

Após 20 minutos, mediu-se a absorvância a 525 nm. A capacidade de seqüestro de radical DPPH foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Capacidade de seqüestro de radical DPPH (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0]100,$$

Onde: A_0 foi a absorvância do controle e A_1 a absorvância na presença do composto.

2.2.2. Atividade quelante de íon ferroso

A atividade quelante de metais foi determinada de acordo com o método de Diniz, Madeira e Almeida¹⁵. As amostras foram utilizadas 50 µl para reação.

Os extratos foram adicionados numa solução de cloreto de ferro 2mM (0,05 mL). A reação iniciava através da adição de 5 mM de ferrozina (0,2 mL) e a mistura era agitada vigorosamente e mantida a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância da solução foi medida espectrofotometricamente a 562 nm. A percentagem de inibição da formação do complexo ferrozina-Fe⁺² foi dada pela fórmula:

$$\text{Atividade quelante de íon ferroso} = [(A_0 - A_1)/A_0]100,$$

Onde: A_0 foi a absorbância do controle e A_1 a absorbância na presença de amostras.

2.2.3. Análise estatística

Todas as medidas foram feitas em triplicata. Os resultados foram analisados com o programa Statistica 6.0. Usando ANOVA e teste-*t* Student's (valor de $p \leq 0,05$) quando adequado para a interpretação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os teores encontrados de fenólicos totais e flavonóides totais das amostras de extratos comerciais de própolis analisadas. Os teores encontrados variaram de $70,60 \pm 0,07$ a $539,10 \pm 1,51$ mg equivalente de ácido gálico por grama para fenólicos totais e de $48,95 \pm 0,13$ a $114,50 \pm 0,13$ mg equivalente de quercetina por g para flavonóides totais. As variações nas concentrações de fenólicos totais e de flavonóides totais ocorre em função de diferentes fatores, tais como a ecologia da flora¹⁶, pelo período da coleta da resina¹⁷, pela genética da abelha rainha⁷, pela flora local e região da coleta^{18,19}.

A amostra que apresentou o teor mais elevado de fenólicos totais foi a amostra F ($539,10 \pm 1,51$ mg equivalente de ácido gálico por grama) que era um extrato aquoso, ao contrário das demais que eram extratos etanólicos. Quanto aos flavonóides totais, a amostra que apresentou o teor mais elevado foi também a amostra F ($114,50 \pm 0,13$ mg equivalente de quercetina por grama), porém não diferindo estatisticamente a amostra E ($110,61 \pm 0,06$ mg de equivalente quercetina por grama).

Os valores encontrados neste trabalho estão dentro dos padrões encontrados por outros autores^{20,21}, sendo que os valores de flavonóides totais é inferior ao de fenólicos totais.

Segundo BRASIL²², os extratos etanólicos de própolis devem conter no mínimo 0,25% de flavonóides e 0,50% de fenólicos. O conteúdo médio de compostos flavonóides e fenólicos (dados não mostrados) foram 0,94 g% e 3,25 g%, respectivamente, verificando que todas as amostras estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação quanto a estes dois princípios.

Como a composição química da própolis é dependente da localização geográfica, a relação entre os fenólicos totais e flavonóides totais está relacionado com a flora e região da coleta^{16,18}. Em estudo realizado sobre a atividade antimicrobiana de própolis²³ foi encontrado teores de fenólicos ($22,03 \pm 0,01$ a $39,38 \pm 0,01$ mg/mL) dez vezes maiores do que o de flavonóides totais ($2,47 \pm 0,15$ a $4,41 \pm 0,02$ mg/mL) para o extrato de própolis oriunda da região Nordeste do Brasil (Tipo 6), já no extrato de própolis oriundo da região Sudeste (Tipo 12) os teores de fenólicos totais ($59,98 \pm 2,25$ a $94,98 \pm 3,23$ mg/mL) foi aproximadamente o dobro dos teores de flavonóides totais ($21,52 \pm 0,01$ a $47,31 \pm 0,06$ mg/mL).

Outros autores²⁴ têm demonstrado também que os teores de compostos fenólicos totais podem variar de acordo com o solvente usado na obtenção do extrato de própolis, sendo que os valores encontrados variaram de 154,83 mg a 295,29 mg/100g de própolis e o extrato etanólico foi a que apresentou o valor mais elevado.

A atividade antioxidante de compostos pode ser de dois tipos, primária quando se liga à radical livres e secundária quando possui capacidade quelante de metais de transição. O sinergismo ocorre quando os dois mecanismos são utilizados²⁵.

A Tabela 2 mostra a atividade antioxidante das amostras de extratos comerciais de própolis quanto a atividade quelante de ferro e capacidade sequestrante de DPPH.

Quanto à atividade quelante as amostras E e F, embora sem diferença estatisticamente significativa entre eles, apresentaram ao valores mais elevados de capacidade complexante, 42,75% e 37,86%, respectivamente.

Segundo Diniz, Madeira e Almeida¹⁵ ao ligarem-se ao íon ferro (metal catalisador de reações), as drogas acetaminofeno e salicilato inibem a continuidade

da propagação da peroxidação lipídica, efeito este que os extratos de própolis também devem provocar ao se complexar com o ferro.

O metal de transição ferro está naturalmente presente diferentes alimentos como nas carnes e pescados, ligado a mioglobina e hemoglobina e assim como o cobre são pró-oxidantes do processo de iniciação da oxidação de lipídios²⁶. Assim, a oxidação lipídica de carnes e pescados seria inibida na ausência de oxigênio, energia e metais¹⁷.

A oxidação lipídica também está intimamente relacionada com a oxidação de cor. O fenômeno de esverdeamento da lingüiça ocorre devido à oxidação do pigmento mioglobina, esta pode levar a oxidação lipídica, a qual também pode ser induzida por outros componentes que possuem ferro ou pelo ferro livre²⁸.

Com relação capacidade sequestrante de DPPH as amostras apresentaram valores entre 80,55 a 92,56%. Os valores encontrados são superiores ao relatado por outros autores, em que a capacidade sequestrante de DPPH do extrato etanólico de própolis apresentou 61,26% de atividade e o padrão de α -tocoferol apresentou 86,7%⁵.

O DPPH é seqüestrado pelos compostos fenólicos por dois mecanismos: (1) conforme a habilidade de doação de hidrogênio aos compostos da reação em cadeia, tornando-os produtos finais estáveis e (2) doação de elétrons do ânion fenóxido (ArOH) para o DPPH. A escolha dos mecanismos depende do poder redox das espécies envolvidas e do número de radicais hidroxil fenólico livres e as suas biodisponibilidades de conjugação²⁵.

A atividade antioxidante forte na própolis pode vir dos flavonóides, como quercetina, flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas, catequinas e isocatequinas. Porém os fenólicos podem participar juntos com os flavonóides na determinação dessas atividades antioxidantes^{23,29}.

A quercetina quando comparada ao ácido ascórbico é um bom quelante e seqüestrador de radical livre, não permitindo a ação das espécies reativas de oxigênio. Já o ácido ascórbico atua como pró-oxidante na presença de metal, gerando espécies reativas de oxigênio, causando uma grande agressão a camada lipídica³⁰.

Os óleos essenciais e o extrato da 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 alimento³¹.

4 CONCLUSÕES

As amostras de própolis possuem compostos fenólicos e flavonóides nas quantidades exigidas pela legislação. Assim como atividade antioxidante comprovada por dois mecanismos (quelante de metal e seqüestrante de radical livre). Os extratos que apresentaram melhor capacidade antioxidante foram as amostras E (etanólico) e F (aquoso).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Nagai, T.; Sakai, M.; Inoue, R.; Inoue, H.; Suzuki, N. *Food Chemistry* **2001**, 75, 237.
2. Nagai, T.; Inoue, R. *Food Chemistry* **2007**, 84, 181.
3. Stocker, A.; Schamel, P.; Kettrup, A.; Bengsch, E. *J. of Trace Elements in Medicine and Biology* **2005**, 19, 183.
4. Weston, R. J. *Food Chemistry* **2000**, 71, 235.
5. Crane, E. *Plenum Press*. **1997**, 1.
6. Pereira, A.; Seixas, F.; Neto, F. R. *Química Nova* **2002**, 25, 321.
7. Park, Y. I. A.; Ikegaki, M.; Abreu, J. A. S.; Alcici, N. M. F. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **1998**, 18, 313.
8. Frankel, E, N. *Food Chemistry* **1996**, 57, 51.
9. Kahl, R.; Hildebrandt, A. G. *Food Chemical Toxicology* **1986**, 24, 1007.
10. Romero, N.; Robert, P.; Masson, L.; Ortiz, J.; Gonzalez, K.; Tapia, K.; Dobaganes, C. *Food Chemistry* **2007**, 104, 383.
11. Ahn, M. R.; Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Bang, K. S.; Nakayama, T. J. *Food Chem.* **2004**, 52, 7286.
12. Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. *Methods in Enzimology* **1999**, 299, 152.
13. Arvouet-Grand, A.; Vennat, B.; Pourrat, A.; Legret, P. *J. Pharm. Belg.* **1994**, 49, 462.
14. Brand-Willians, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. *Lebens. Wissens. and Techonol.* **1995**, 28, 25.

15. Diniz, T. C. P.; Madeira, V. M. C.; Almerida, L. M. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1994**, 315, 161.
16. Park, Y. K.; Alencar, S. M.; Scamparine, A. R. P.; Aguiar, C. L. *Ciência Rural* **2002**, 2, 997.
17. Rocha, L.; dos Santos, L. R.; Arcenio, F.; Carvalho, E. S.; Lúcio, E. M. R. A.; Araújo, G. L.; Teixeira, L. A.; Sharapin, N. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2003**, 13, 71.
18. Bankova, V. *J. Ethnopharmacol* **2005**, 100, 114.
19. Sousa, J. P. B.; Furtado, N. A. J. C.; Jorge, R.; Soares, A. E. E.; Bastos, J. K. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, 17, 85.
20. Moreira, L.; Dias, L. G.; Pereira, J. A.; Estevinho, L. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, 46, 3482.
21. Kalogeropoulos, N.; Konteles, S. J.; Troullidou, E.; Mourtzinou, I.; Karathanos, V. T. *Food Chemistry* **2009**, 116, 452.
22. BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAA). Secretaria de Defesa Agropecuária. Anexo VII. Instrução Normativa Nº 3, de 19 de janeiro de 2001.
23. Castro, M. L.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L.; Alencar, S. M.; Masaharu, I.; Duarte, S.; Koo, H. *Química Nova* **2007**, 30, 1512.
24. Cabral, I. S. R.; Oldoni, T. L. C.; Prado, A.; Bezerra, R. M. N.; Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P. L. *Química Nova* **2008**, 32, 1523.
25. Fennema, O. R. *Química de los alimentos*. 2ªed, Acribia: Zaragoza, **2000**, 1258.
26. Shahidi, F.; Hong, C. *Food chemistry* **1991**, 42, 339.
27. Rodrigues – Estrada, M. *Meat Science* **1997**, 45, 365.
28. Olivo, R.; Scares, A. L.; Ida, E. I.; Shimokomaki, M. J. *Food Biochemistry* **2001**, 25, 271.
29. Silva, J. F. M.; Souza, M. C.; Matta, S. R.; Andrade, M. R.; Vidal, F. V. N. *Food Chemistry* **2006**, 99, 431.
30. Figueiredo, P. S. F.; Oliveira, R. F.; Silva, J. G.; Alcanfor, S. K. B.; Romeiro, L. A. S. *29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia. São Paulo – SP, 2006*.
31. Mariutti, L. R. B.; Bragagnolo, N. *Brazilian Journal of Food Technology* **2007**, 10, 96.

Tabela 1. Conteúdos totais de flavonóides e dos fenólicos totais em amostras comerciais dos extratos de própolis de Santa Maria - RS.

Amostras	Fenólicos (mg de ácido gálico/100g)	Flavonóides (mg de quercetina/100g)
A	299,57 ± 1,19 ^c	70,06 ± 0,07 ^a
B	70,60 ± 0,24 ^a	48,95 ± 0,13 ^a
C	123,52 ± 0,40 ^b	80,66 ± 0,11 ^a
D	389,03 ± 0,48 ^c	81,37 ± 0,04 ^a
E	345,74 ± 0,33 ^c	110,61 ± 0,06 ^b
F	539,10 ± 1,51 ^d	114,50 ± 0,13 ^b

Os resultados acima são a média ± desvio padrão (n=3).

Valores com a mesma letra são iguais estatisticamente (p<0,05).

Tabela 2. Valores % atividade quelante de metal e capacidade sequestrante de DPPH em amostras comerciais de extratos de própolis de Santa Maria – RS.

Amostras	% atividade quelante	% sequestrante de DPPH
A	13,05 ± 1,05 ^a	91,83 ± 0,08 ^a
B	16,31 ± 2,22 ^a	80,55 ± 0,76 ^b
C	12,38 ± 0,72 ^a	92,56 ± 0,08 ^a
D	1,01 ± 1,59 (*)	91,83 ± 0,80 ^a
E	42,76 ± 1,60 ^b	89,68 ± 0,21 ^b
F	37,86 ± 3,06 ^b	89,31 ± 0,60 ^b

Os resultados acima são a média ± desvio padrão (n=3).

Valores com a mesma letra são iguais estatisticamente (p<0,05).

(*) A amostra D não se comportou conforme o esperado na técnica, ficando muito abaixo das demais

4.2 Artigo 2

ADIÇÃO DE EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS E EXTRATO DE CHÁ VERDE EM PÓ NA FABRICAÇÃO DE LINGÜIÇA TOSCANA¹**Elizângela ALVES²****Em fase de revisão pelo autor para ser submetido à Revista Ciência Rural.**

¹ Manuscrito recebido em

² Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CCR, UFSM.

*Email: elizangela.farma@gmail.com

* A quem a correspondência deve ser enviada.

Resumo

Em produtos cárneos frescos como a lingüiça, a trituração da matéria-prima, a quantidade de gordura e a ausência do processamento térmico, a tornam susceptível a deterioração, tanto por reações químicas indesejáveis quanto por contaminação microbiana. Este trabalho teve como objetivo avaliar a adição do extrato aquoso de própolis e extrato de chá verde em pó nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de lingüiças toscanas. Os tratamentos foram: controle, quatro concentrações de extrato aquoso de própolis (0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,4%) e 0,1% de extrato de chá verde em pó. As análises de proteína, gordura, umidade, cinzas, *Salmonella*, Coliformes a 35 °C, Coliformes a 45 °C, *Staphylococcus* coagulase positiva e análise sensorial foram realizadas após a elaboração, além das análises de pH, TBARS e contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios que foram realizadas nos dias 5, 10, 15, 20 e 27 após a elaboração para o acompanhamento da vida de prateleira. Os resultados dos teores de proteína, gordura, umidade, cinzas e pH não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) entre o controle e os demais tratamentos. O extrato aquoso de própolis e o extrato em pó de chá verde apresentaram atividade antioxidante por um período de 20 dias, sendo que o extrato aquoso de própolis também apresentou atividade antimicrobiana pelo mesmo período.

Palavras-chave: lingüiça toscana, antioxidante, antimicrobiano, extrato de própolis, vida de prateleira.

Summary

In meat products such as sausage, the comminuting, fat content and absence of thermal treatment was responsible of susceptibility to chemical and microbiological deterioration. This study aimed to evaluate the composition and acceptance of sausages made with propolis. Were six treatments, a control without propolis, four treatments with different concentrations of water extract of propolis (0.1%, 0.2%, 0.3% and 0.4%) and 0,1% of green tea extract powder. The experiment was conducted with four replications. Analyses were made of protein, fat, moisture, ash and sensory analysis after the manufacture of sausages. The analysis of pH, TBARS and microbiological had six times in order (0, 5, 10, 15, 20 and 27 days) to compare the changes and the likely increase in shelf life. The results of protein, fat, moisture, ash and pH did not differ ($p > 0.05$) between control and other treatments. Water extract of propolis and green tea extract powder showed antioxidant activity for 20 days, while the water extract of propolis also showed antimicrobial activity for 20 days.

Keywords: sausage, propolis, shelf-life, antioxidant, antimicrobial.

INTRODUÇÃO

Lingüiça é 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 (BRASIL, 2000). Dependendo do teor de gordura, já que o regulamento técnico estabelece até o máximo de 30%, além da trituração da matéria-prima e a ausência do processamento térmico, este produto é susceptível a deterioração, tanto por reações químicas indesejáveis quanto por contaminação microbiana.

A deterioração química mais comum que ocorre em produtos cárneos é a oxidação lipídica (RHEE, ANDERSON & SAMS, 1996). As alterações provocadas pela oxidação lipídica em produtos cárneos variam largamente, podendo ser alterações de flavor, perda de cor, danos estruturais nas proteínas a perda nutricional (XIONG, 1996), sendo que estas alterações podem levar a rejeição de produtos por parte dos consumidores. Desta forma, a prevenção da oxidação lipídica e a inibição do crescimento microbiano podem ter uma contribuição significativa para o aumento da vida útil destes produtos.

Atualmente, para a prevenção da oxidação lipídica e do crescimento microbiano tem-se usado antioxidantes e antimicrobianos naturais. Extratos de diferentes vegetais têm sido usados com esta finalidade. SEBRANEK et al. (2005) compararam extrato de alecrim comercial com antioxidantes sintéticos BHA/BHT em embutido suíno e encontraram que o extrato de alecrim tinha eficiência similar aos sintéticos. Outros autores estudaram o efeito do α -tocoferol na prevenção da oxidação lipídica pelo fato do mesmo competir pelo substrato e também retardar a decomposição dos hidroperóxidos (FRANKEL, 1998). O óleo essencial de orégano também tem sido usado em embutidos apresentando efeito antimicrobiano, entretanto, para se conseguir o efeito bactericida a concentração necessária é elevada, o que provoca alterações sensoriais nos produtos (BUSATTA et al., 2008). SOUZA et al. (2006) relatam a atividade antioxidante de extrato da casca de batata em cortes de frango armazenados sob congelamento.

A própolis é uma substância resinosa natural coletada pelas abelhas melíferas (*Apis melífera* L) de botões florais e folhas de árvores e plantas, misturada com o pólen e enzimas secretadas pelas abelhas (MARCUCCI, 1995). As abelhas

usam a própolis com o objetivo de se proteger de invasores externos (BURDOCK, 1998). A própolis é considerada como responsável pela baixa incidência de bactérias e fungos dentro das colméias, sendo a ação antimicrobiana uma característica essencial e usada pelo ser humano há séculos por suas características farmacêuticas (BANKOVA et al, 2000). Além disso, a própolis também apresenta atividade antioxidante (BURDOCK, 1998). As propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes combinado com o fato de que muitos dos seus constituintes estão presentes em alimentos ou aditivos alimentares e por ser considerado GRAS (Generally Recognised as Safe) (BURDOCK, 1998) a tornam um candidato em potencial como um antimicrobiano e antioxidante natural para utilização em alimentos.

Desta forma este trabalho teve como objetivo testar o potencial antimicrobiano e antioxidante de extrato aquoso de própolis em lingüiça toscana armazenada sob refrigeração a 4°C. Foram também avaliadas a composição centesimal, as características microbiológicas e as características sensoriais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Lingüiça toscana

A produção das lingüiças ocorreu na planta piloto do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos de acordo com TERRA (1998). A carne suína foi adquirida no comércio local e estocada sob temperatura de 4°C por 24 horas até sua utilização no preparo das lingüiças. A carne foi moída em moedor com disco de 8 mm, e posteriormente foi colocada no misturador para homogeneização com os demais ingredientes. A massa obtida (CO) foi subdividida em partes iguais de 4,6Kg e foram adicionadas 0,1% (CV) de extrato em pó de chá verde, 0,1% (P1), 0,2% (P2), 0,3% (P3) e 0,4% (P4) de extrato aquoso de própolis. O extrato aquoso de própolis usado foi adquirido no comércio local e apresentava conteúdo médio de 12% de extrato seco. O chá verde usado foi o extrato solúvel de chá verde em pó adquirido no comércio local.

Análises físico-química

As análises de umidade, proteínas e cinzas foram realizadas conforme a metodologia da AOAC (2003). A determinação de lipídios foi realizada pelo método

de butirômetro de leite (BRASIL, 1999). O pH foi determinado de acordo TERRA & BRUM (1998). As análises foram feitas em quadruplicata.

Determinação de TBARS

As Substancias Reativas ao Ácido Tio-barbiturico (TBARS) foi realizada de acordo com RAHARJO et al. (1992). O resultado foi expresso em mg MDA/Kg de amostra. As medidas foram feitas em quadruplicata.

Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas realizadas de acordo com BRASIL (2003) foram: *Salmonella*, Coliformes a 35°C (UFC/g), Coliformes a 45°C (UFC/g), *Clostridium* sulfito redutores (UFC/g), *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g) e contagem total de mesófilos aeróbios (UFC/g). As análises foram realizadas em quadruplicata.

Análise sensorial

Os tratamentos foram submetidos à análise sensorial, utilizando painel não treinado, constituído de 80 provadores, adultos, de ambos os sexos. Foi feito teste de aceitação (DUTCOSKI, 1996), escala hedônica de sete pontos (1= desgostei muitíssimo; 7= gostei muitíssimo), para avaliar cor, odor e sabor dos produtos desenvolvidos e teste de atitude de compra, escala hedônica de sete pontos (1=nunca compraria; 7= compraria sempre).

Análise Estatística

Todas as medidas foram feitas em quadruplicata. Os resultados foram analisados com o programa Statistica 6.0. Usando ANOVA e teste-*t* Student's (valor de $p \leq 0,05$) quando adequado para a interpretação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de extrato aquoso de própolis não influenciou significativamente os teores de umidade, carboidratos, gordura, proteínas e cinzas (Tabela 1). Quando comparado com os padrões físico-químicos estabelecidos pelo regulamento técnico de identidade e qualidade para lingüiças (BRASIL, 2000), verificou-se que todas as características estabelecidas foram atendidas. O regulamento técnico estabelece o

teor de umidade em máximo de 70%, gordura em máximo de 30%, proteína em mínimo de 12%, quanto aos teores de carboidratos e cinzas não existem valores estabelecidos, sendo o teor de cálcio limitado ao máximo de 0,1% em base seca. O teor de gordura encontrado ficou bem abaixo do máximo estabelecido pela legislação para este tipo de produto tendo em vista que o produto foi elaborado apenas com pernil suíno, sem adição de outra fonte de gordura. Se comparado com lingüiças toscanas disponíveis no comércio, os produtos deste trabalho poderiam ser considerados com lingüiças lights por comparação com os valores relatados na tabela nutricional. Os teores de gordura encontrados foram também inferiores aos encontrados por FERREIRA et al (2009) que estudaram lingüiças com teor reduzido de gordura. O cálcio não foi avaliado neste trabalho, tendo em vista que na formulação não foi utilizada matéria-prima que afetasse este elemento, uma vez que normalmente ocorre aumento deste mineral quando existe a utilização de carnes mecanicamente separadas.

Durante o armazenamento de produtos cárneos como as lingüiças, diferentes características podem sofrer alterações. Entre as características químicas podem ser citados o pH e a oxidação lipídica. A variação de pH durante o armazenamento refrigerado a 4°C por 27 dias está apresentada na Tabela 2. Pode-se verificar que o mesmo permanece com valores próximos aos iniciais até o dia 15, a partir do qual se observa um aumento indicando que processos proteolíticos com liberação de produtos com natureza alcalina. Aos 27 dias de armazenamento, o pH já encontra-se próximo a 7,0. Este fato pode estar associado ao aumento da população de bactérias como as *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*, que causam a degradação protéica e de aminoácidos, resultando na formação de amônia e aumento do pH (NYCHAS et al., 1998).

A Figura 1 mostra que com o tempo de armazenamento houve um aumento nos valores de TBARS. Pode-se verificar que até os 20 dias de armazenamento os valores estão abaixo de 0,50mg de malonaldeído/Kg de amostra para todos os tratamentos com exceção do controle, indicando que os mesmos não apresentaram alterações sensoriais perceptíveis já que os aromas de ranço em carnes são inicialmente detectados em valores de 0,5 a 2,0mg malonaldeído/ kg de carne (O'NEILL et al.,1998). Pode-se observar também que os valores de TBARS foram mais baixos nos tratamentos, principalmente aqueles em foram adicionados o extrato de própolis, confirmando estudos que relatam que a própolis apresenta

atividade antioxidante (MOREIRA et al., 2008). Já no 27º dia os valores encontrados estão acima de 1,59mg de malonaldeído/Kg considerado prejudicial à saúde (TORRES & OKANI, 2000), com exceção do tratamento com adição de 0,2% de extrato aquoso de própolis.

Na Tabela 3 está apresentada as características microbiológicas das lingüiças. A legislação brasileira vigente para este tipo de produto (BRASIL, 2001) estabelece ausência para *Salmonella*, máximos de 5×10^3 UFC/g, 5×10^3 UFC/g e 3×10^3 UFC/g, respectivamente para Coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Clostridium* sulfito redutores a 46°C. Desta forma, observou-se que os produtos atenderam os requisitos microbiológicos legais vigentes.

Em relação à análise microbiológica pode-se observar pela Figura 2, que em relação aos microrganismos aeróbios mesófilos a adição de 0,1, 0,2 e 0,3% de extrato aquoso de própolis mostrou-se eficiente, pois manteve a contagem em valores muito próximo da inicial durante os 27 dias de armazenamento refrigerado a 4°C, confirmando estudos anteriores realizados por KOO et al. (2000). KALOGEROPOULOS et al. (2009) relatam que os extratos etanólicos de própolis da Grécia e do Chipre apresentaram espectro de inibição comparáveis ao da nisina, um antimicrobiano (bacteriocina) usado em alimentos produzido por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e usado como conservador natural em queijos processados, leite, produtos enlatados, ovo líquido entre outros alimentos.

Os resultados da avaliação sensorial podem ser vistos na Tabela 4. Não houve diferença estatisticamente significativa nos atributos avaliados pelos provadores ($p > 0,05$).

Os resultados da análise sensorial demonstraram que as adições de extrato aquoso de própolis e de extrato em pó de chá verde não influenciaram significativamente as características sensoriais das lingüiças. Entretanto, observando-se o atributo sabor verifica-se que apesar não existir diferença significativa entre os tratamentos, concentrações de extrato de própolis acima de 0,2% podem ter afetado negativamente, pois foram os menos aceitos.

A intenção de compra dos produtos está representada na figura 3, nela 82,5% dos avaliadores opinaram que comprariam a amostra com 0,1% de extrato de chá verde, seguidas de 77,5%, 75%, 72,5%, 67,5% e 60% para as amostras controle, 0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,4% de extrato aquoso de própolis, respectivamente.

CONCLUSÕES

As adições de extrato de chá verde e de extrato aquoso de própolis não afetaram as características físico-químicas das lingüiças Toscanas. Os extratos de chá verde e aquoso de própolis foram eficientes na inibição da oxidação lipídica durante o armazenamento refrigerado por um período de 20 dias. O extrato aquoso de própolis mostrou-se eficiente no controle microbiológico de microrganismos aeróbios mesófilos durante 20 dias de armazenamento refrigerado. Sensorialmente no atributo sabor foi observada menor preferência dos produtos adicionados com concentrações maiores que 0,2% de extrato de aquoso. Em todas as lingüiças Toscanas houve uma intenção de compra positiva, a partir de 60%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the association of the official analysis chemists**. 16.ed. Arlington,1995. 1750p.

BANKOVA, V. S. et al. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3–15, 2000.

BRASIL. Instituição Normativa nº4 de 31 de março de 2000. Anexo – **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Lingüiça**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2000. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7778>. Acesso em: 04 de novembro de 2009.

BRASIL. Resolução RDC nº12 de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Ministério da Saúde, 2001. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144>. Acesso em: 04 de novembro de 2009.

BRASIL. Instrução Normativa nº62 de 26 de agosto de 2003. Anexo - **Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle dos produtos de origem animal e água**. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, 2003.

BRASIL. Instrução Normativa nº20 de 21 de julho de 1999. Anexo - **Métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes - sal e salmoura**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1999.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chemistry and Toxicology**, v.36, p.347–363, 1998.

BUSATTA, C. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v.25, p.207–211, 2008.

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

FERREIRA, A.C.B. et al. Composição centesimal e aceitação de lingüiça elaborada com reduzido teor de gordura e adicionada de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p. 209-214, 2009.

FRANKEL, E. N. **Lipid oxidation**. Dundee, Scotland: The Oily Press Ltd. 1998.

KALOGEROPOULOS, N. et al. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**, v.116, p.452–461, 2009.

KOO, H. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica Montana against oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, v. 45, p.141-148, 2000.

MARCUCCI, M. C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, p.83–99, 1995.

MOREIRA, L. et al. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of própolis samples from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.3482-3485, 2009.

NYCHAS, G.J.E. et al. Chemical changes in stored meat. **The Microbiology of Meat and Poultry**. p. 288-326, 1998.

O'NEILL, L.M. et al. Comparison of effects of dietary olive oil, tallow and vitamin E on the quality of broiler meat products. **British Poultry Science**, v.39, p.365-371, 1998.
RHEE, K. S. et al. Lipid oxidation potential of beef, chicken and pork. **Journal of Food Science**, v.61,p. 8- 12, 1996.

SEABRA, L.M.A.J. et al. Fécula de mandioca e farinha de aveia como substitutos de gordura na formulação de hambúrguer de carne ovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.22, n.3, p.244-248, 2002.

SEBRANEK, J.G. Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. **Meat Science**, v.69, p. 289–296, 2005.

SOUZA, M.A. **Casca de batata inglesa (*Solanum tuberosum*) na proteção antioxidante da carne de frango**. 2006. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

TERRA, N.N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo, Ed. Unisinos, 1998. 216p.

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

TORRES, E.A.F.S.; OKANI, E.T. Teste de TBA: ranço em alimentos. **Revista Nacional da Carne**, n.243: p.68-78, 1997.

XIONG, Y. Impacts of oxidation on muscle protein functionality. **Proceedings of the Reciprocal Meat Conference**, v.49, p.79–86, 1996.

Tabela 1. Características físico-químicas de lingüiças toscanas com diferentes concentrações de extrato aquoso de própolis.

	Tratamentos					
	CO	CV	P1	P2	P3	P4
Cinzas (%)	3,54	3,47	3,45	3,57	3,61	3,50
Gordura (%)	7,68	7,68	7,71	7,68	7,71	7,71
Umidade (%)	69,73	69,98	67,80	69,79	69,64	65,70
Proteína (%)	13,26	13,36	13,21	14,32	13,21	14,33
Carboidratos (%)	5,79	5,51	7,83	4,64	5,83	8,76

Os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas linhas ($p > 0,05$).

CO= controle; CV= Chá-Verde em pó 0,03%; P1= 0,1% de extrato aquoso de própolis; P2= 0,2% de extrato aquoso de própolis; P3 = 0,3% de extrato aquoso de própolis; P4= 0,4% de extrato aquoso de própolis.

Tabela 2. Variação do pH durante o armazenamento refrigerado de lingüiças toscana com diferentes concentrações de extrato aquoso de própolis.

	dia zero	dia cinco	dia dez	dia 15	dia 20	dia 27
CO	5,59±0,01	5,83±0,05	5,77±0,05	5,75±0,01	6,3±0,03	6,63±0,06
CV	5,45±0,02	5,8±0,01	5,73±0,01	5,5±0,09	6,29±0,01	6,81±0,02
P1	5,48±0,01	5,75±0,03	5,61±0,1	5,7±0,01	6,35±0,03	6,63±0,02
P2	5,62±0,01	5,85±0,01	5,67±0,03	5,6±0,02	6,13±0,05	6,78±0,01
P3	5,54±0,01	5,85±0,01	5,72±0,01	5,71±0,02	6,3±0,01	6,71±0,02
P4	5,53±0,02	5,85±0,01	5,72±0,06	5,71±0,02	6,21±0,06	6,98±0,03

CO= controle; CV= Chá-Verde em pó 0,03%; P1= 0,1% de extrato aquoso de própolis; P2= 0,2% de extrato aquoso de própolis; P3 = 0,3% de extrato aquoso de própolis; P4= 0,4% de extrato aquoso de própolis

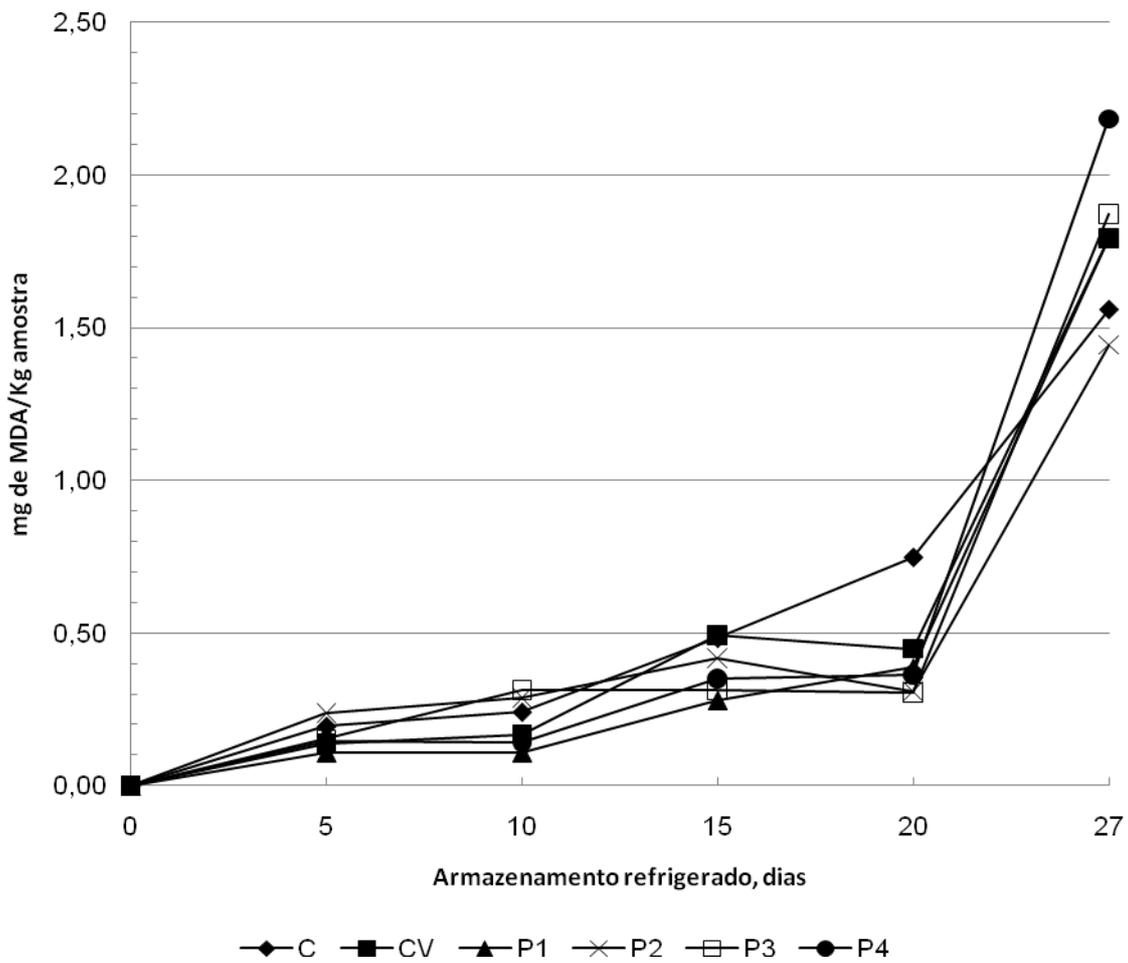


Figura 1. Variação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) durante o armazenamento refrigerado a 4°C por 27 dias.

CO= controle; CV= Chá-Verde em pó 0,03%; P1= 0,1% de extrato aquoso de própolis; P2= 0,2% de extrato aquoso de própolis; P3 = 0,3% de extrato aquoso de própolis; P4= 0,4% de extrato aquoso de própolis.

Tabela 3. Características microbiológicas de lingüiças toscanas adicionadas de extrato em pó de chá verde e extrato aquoso de própolis.

	CO	CV	P1	P2	P3	P4
<i>Salmonella</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Coliformes a 35°C (log)	5,87	5,84	5,79	5,71	5,69	5,82
Coliformes a 45°C (log)	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
<i>Clostridium</i> sulfito reductores (log)	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
<i>Staphylococcus</i> coagulase + (log)	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Contagem total de Mesófilos (log)	6,54	6,38	7,91	7,64	6,57	6,64

CO= controle; CV= Chá-Verde em pó 0,03%; P1= 0,1% de extrato aquoso de própolis; P2= 0,2% de extrato aquoso de própolis; P3 = 0,3% de extrato aquoso de própolis; P4= 0,4% de extrato aquoso de própolis

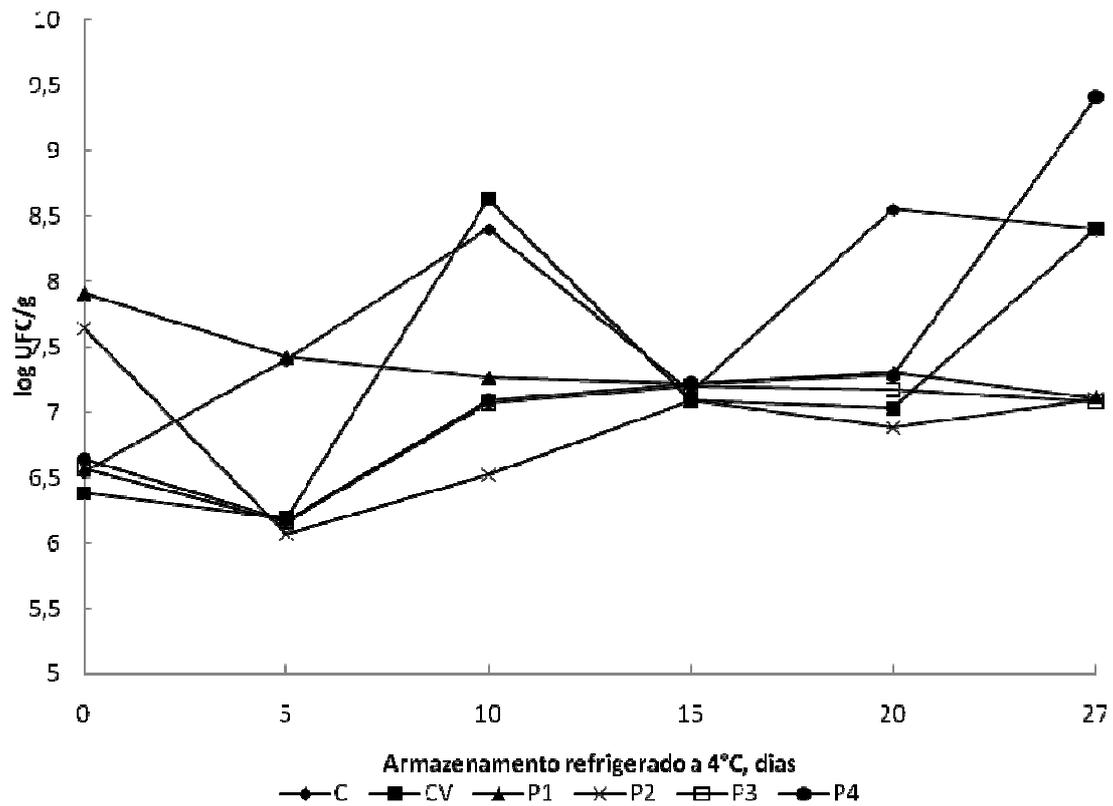


Figura 2. Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos de lingüiças toscanas adicionadas de extrato em pó de chá verde e extrato aquoso de própolis durante o armazenamento refrigerado a 4°C por 27 dias.

CO= controle; CV= Chá-Verde em pó 0,03%; P1= 0,1% de extrato aquoso de própolis; P2= 0,2% de extrato aquoso de própolis; P3 = 0,3% de extrato aquoso de própolis; P4= 0,4% de extrato aquoso de própolis.

Tabela 4. Valores médios da avaliação sensorial dos diferentes tratamentos de lingüiças Toscanas

	CO	CV	P1	P2	P3	P4
Cor	5,9	5,5	5,7	5,6	5,5	5,5
Aroma	5,8	6,5	5,7	5,4	5,3	5,7
Sabor	6,5	6,8	6,7	5,9	5,5	5,5

Os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas linhas ($p > 0,05$).

CO= controle; CV= Chá-Verde em pó 0,03%; P1= 0,1% de extrato aquoso de própolis; P2= 0,2% de extrato aquoso de própolis; P3 = 0,3% de extrato aquoso de própolis; P4= 0,4% de extrato aquoso de própolis.

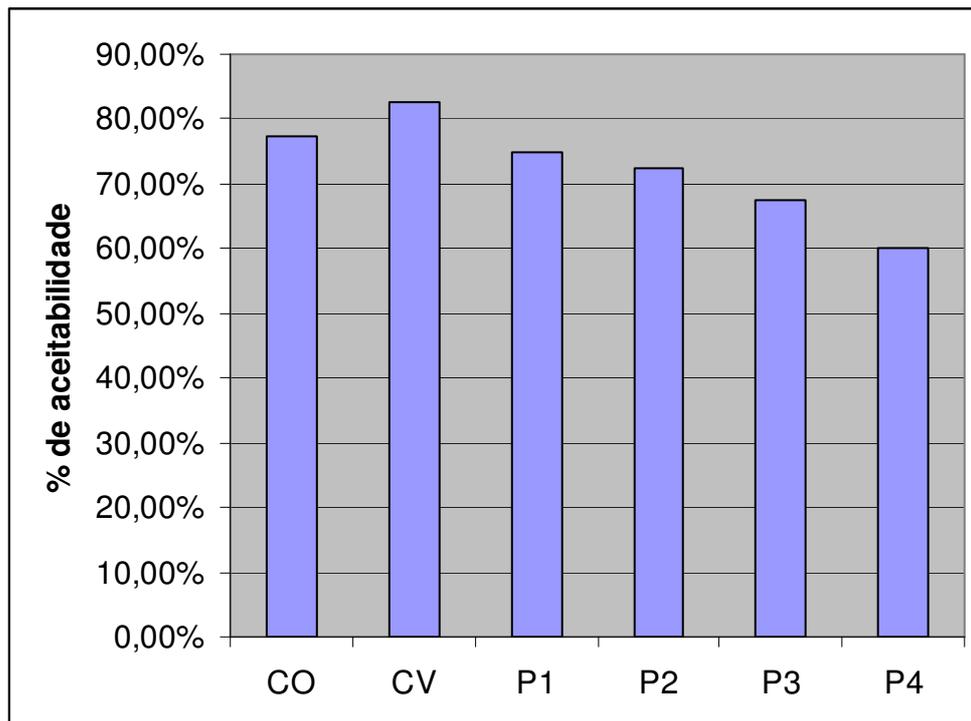


Figura 3. Intenção de compra de lingüiças Toscanas adicionadas de extrato em pó de chá verde e extrato aquoso de própolis para armazenamento refrigerado a 4°C por 27 dias.

CO= controle; CV= Chá-Verde em pó 0,03%; P1= 0,1% de extrato aquoso de própolis; P2= 0,2% de extrato aquoso de própolis; P3 = 0,3% de extrato aquoso de própolis; P4= 0,4% de extrato aquoso de própolis.

5. DISCUSSÃO

As seis amostras comerciais analisadas possuíram de 70,60 mg a 539,10 mg de ácido gálico/100 g de extrato de fenólicos totais e 48,95 mg a 114,50 de mg de quercetina/100 g de extrato de flavonóides totais. Segundo Chaillou et al (2004), a composição das própolis estão ligadas as espécies botânicas da região onde as abelhas coletam as resinas para a sua produção.

A Farmacopéia Brasileira (2005) informa que o clima da região Sul também favorece ao cultivo das colméias de abelhas, sendo a matéria-prima nobre utilizada para o mercado internacional mais exigente como o Japão, a China e a Alemanha.

A própolis é uma resina protetora da colméia e um dos subprodutos das abelhas *Apis mellífera*, ao lado do mel e da geléia real, mostrando-se totalmente variável quanto a composição, como no primeiro experimento, onde as amostras analisadas obtiveram valores altos, mas seguiram o padrão de outros trabalhos em que os fenólicos encontram-se em maior quantidade (SILVA et al, 2006; CHAILLOU et al, 2004).

Embora as técnicas colorimétricas não caracterizem molecularmente os componentes, estão na metodologia de muitos trabalhos (MEDA et. al. 2005; MENDES DA SILVA et al., 2006; BERTONCELJ et al., 2007) e conseguem comprovar a relação direta que existe destes compostos com a sua ação biológica positiva “in vitro” e “in vivo”.

Os flavonóides e os ácidos fenólicos são as maiores classes de compostos fenólicos, suas relações com atividade antioxidante refletiu em estudos sobre a prevenção do câncer (TAPIERO et al, 2002).

Nos testes “in vitro”, foi comprovada a marcante ação antioxidante das própolis tanto na classe primária, que atuam como redutores e se ligam a radicais livres como o DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) quanto na secundária, que possui capacidade quelante de metais de transição como o ferro na forma de cloreto, impedindo reações oxidantes aceleradas.

Os melhores percentuais quelantes foram os das amostras E ($42,76 \pm 1,60$) e F ($37,86 \pm 3,06$) embora não se diferenciem estatisticamente. As amostras A

(13,05±1,05), B (16,31±2,22) e C (12,38±0,72) obtiveram valores inferiores aos demais. Enquanto D não reagiu conforme esperado na técnica.

O íon ferro está naturalmente presente nos pescados, ligado a mioglobina e hemoglobina e assim como o cobre são prooxidantes do processo de iniciação da oxidação de lipídios (SHAHIDI & HONG, 1991). Assim, oxidação de pescados é desfavorecida na ausência de oxigênio, energia e metais (RODRIGUES – ESTRADA, 1997).

A oxidação lipídica também está interdependente a oxidação de cor. O fenômeno de esverdeamento da lingüiça ocorre devido à oxidação do pigmento mioglobina, esta leva a oxidação lipídica, a qual também pode ser induzida por outros componentes que possuem ferro ou pelo ferro livre (OLIVO et al, 2001).

A capacidade seqüestrante de radical - livre DPPH foi alta em todas as amostras de própolis analisadas neste trabalho, sendo a média de 89,29%. O desenvolvimento e a utilização de antioxidantes de origem natural são desejados. Ao evitar doenças cardiovasculares ou até mesmo o câncer, a própolis amplia as suas muitas atividades biológicas. Por outro lado, conforme a biogeografia (a colméia, as regiões e a época do ano) ocorre diferentes composições e conseqüentemente há diferenças na atividade antioxidante (TEIXEIRA et al, 2008).

Segundo Teixeira et al (2008), não existe uma correlação direta da capacidade anti radical DPPH com a concentração de compostos antioxidantes, podendo ocorrer sinergismo com outras substancias presentes no extrato de própolis, ou seja, uma mistura de componentes é responsável pelo poder antioxidante.

O segundo experimento selecionou a própolis para aplicação em lingüiça Toscana por possuir uma das melhores caracterizações quanto a composição (fenólicos e flavonóides totais) e atividade antioxidante (quelante e sequestrante). A sua escolha também se baseou na base aquosa, evitando um provável gosto residual do álcool presente nas demais.

A lingüiça Toscana, como todo produto cárneo, tem a sua qualidade relacionada a matéria-prima carne e aos demais ingredientes de boa procedência. Um exemplo disso seria a suplementação da dieta animal com vitamina E, a redução dos teores de ferro e cobre antes do abate animal e minimiza assim injúrias causadas pelo estresse oxidativo na carne (OLIVO et al, 2001).

As concentrações do extrato adicionado na massa não alteraram a dos demais ingredientes, em escala crescente foram elas: 0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,4%. O controle positivo utilizado foi o chá verde à 0,1%. Conforme o esperado, as análises físico-químicas foram iguais estatisticamente entre os tratamentos. A média com o padrão, as cinzas, a gordura, a umidade e a proteína foram 3,52%, 7,69%, 68,77% e 13,61%, respectivamente e seguiram o padrão de lingüiça frescal (BRASIL, 2000).

Devido ao potencial dano hepático e carcinogênese em animais de laboratório, antioxidante sintéticos como o BHA, o BHT e o TBHQ estão sendo cuidadosamente utilizados na indústria de alimentos (SHIMAZAWA M et al, 2005).

A utilização de antioxidantes junto com os ingredientes, como o chá-verde ou a própolis, aumentou consideravelmente a qualidade da lingüiça Toscana. A associação com a armazenagem refrigerada conseguiu manter o pH e a proliferação microbiana sob certo controle.

Durante as análises do pH, manteve-se com um comportamento semelhante entre si na 1ª semana, em que ocorreu a análise sensorial, não houve diferença estatística de pH nas lingüiças, mantendo em 5,7 e 5,8, ou seja, este fator não influenciou nas análises iniciais. O ligeiro decréscimo no 10º dia foi seguido de aumento para próximo a 7,0 até o último dia de análise, em que bactérias como as *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*, que causam a degradação protéica e aminoácida, resultam na formação de amônia (NYCHAS, DROSINOS & BOARD, 1998).

Quanto às características microbiológicas, as lingüiças produzidas atenderam a especificações estabelecidas pela legislação (BRASIL, 2001), pois apresentou ausência de *Salmonella* e contagens de Coliformes a 45°C (fecais), de *Staphylococcus coagulase* positiva e *Clostridium sulfito* redutores abaixo dos valores máximos estabelecidos. Entretanto a contagem de *Coliformes* a 35°C e de *Mesófilos* foram elevadas, mostrando problemas relacionados com a qualidade inicial da matéria prima ou das condições de higiene de processamento.

Apesar da contagem elevada de microrganismos mesófilos, a adição do extrato aquoso de própolis apresentou capacidade de inibição do crescimento microbiano confirmando relato da literatura (KOO et al, 2000).

Em relação à oxidação lipídica na lingüiça toscana, verificadas pela técnica de TBARS, observou-se que até o dia 20 as amostras com própolis e extrato de chá verde apresentaram valores de malonaldeído não detectáveis sensorialmente que é

abaixo de 0,5 mg/Kg de amostra. A oxidação lipídica é a maior responsável pela perda de qualidade e desenvolvimento de off-flavor (TEIXEIRA et al, 2008). Além de prevenir a deterioração lipídica, o antioxidante pode ser agregador de valor na cadeia produtiva da indústria alimentícia.

A avaliação sensorial pelos painelistas indicou que as lingüiças Toscanas produzidas com extrato de própolis, foram estatisticamente, idênticas entre si em todos os parâmetros analisados (cor, aroma e sabor), em comparação com o Controle. O tratamento CV foi considerado mais aceitável, em virtude, talvez, de possuir sabores e aromas mais suaves que os consumidores brasileiros são adaptados (TERRA, 1998). O tratamento P4 já possuía o aroma mais característico da própolis, resultando em menor aceite.

Segundo Lappe et al (2004), na aspersão de própolis sobre os salames resultou em produtos com qualidade organolépticas semelhante, alterando apenas a textura da amostra que recebeu mais própolis.

Embora se queira preservar os alimentos de futuras alterações com o uso de ingredientes, sabe-se que adicionar a própolis no processo de produção não irá reverter uma matéria-prima já oxidada ou em fase de terminação. Os próximos testes serão realizados em matérias-primas de ótima qualidade e priorizará em enriquecer a sua formulação e vida de prateleira.

6. CONCLUSÃO

Os extratos de própolis analisados continham compostos fenólicos e flavonóides em quantidades exigidas pela legislação, além de comprovada atividade antioxidante pelo método quelante e pelo seqüestro de radical DPPH.

A adição de própolis em base aquosa em lingüiça Toscana manteve a composição físico-química em todas as adições, assim como o controle e o padrão chá-verde também.

As alterações microbiológicas, de pH e de oxidação lipídica, durante armazenamento refrigerado, foram favorecidas com o uso da própolis e do chá-verde.

Este trabalho serve como base de conhecimento para uma nova linha de pesquisa, que necessita de posteriores adequações e aprimoramentos a fim de alcançar os seus objetivos. A aceitabilidade da lingüiça Toscana nos diferentes tratamentos adicionados de própolis permitirá agregar funcionalidade da mesma na sua formulação.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. **Avaliação físico-química e microbiológica de lingüiça Toscana porcionada e armazenada em diferentes embalagens, sob condições em estocagem similares as praticadas em supermercado.** 2005 Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005

AHH, D. U. *et al.* Effects of dietary vitamin E supplementation on lipid oxidation and volatiles content f irradiated cooked turkey meat patties with different packaging. **Poultry Science**. v. 77, p. 912-920, 1998.

AHN, M.R. *et al.* Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **Journal Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 7286-7292, 2004.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the association of the official analysis chemists.** 16.ed. Arlington, 1995. 1750p.

ARAUJO, J.M.A. **Química dos Alimentos – teoria e prática.** Viçosa: UFV. 1999.

ARVOUET-GRAND, A. *et al.* Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 49, p. 462-468, 1994.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potencial uses. **Food Chemistry**. v.99, p. 191-203, 2006.

BANKOVA, V. S. *et al.* Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3–15, 2000.

BERTONCELJ, J. *et al.* Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, p. 822-828, 2007.

BIXBY, M. *et al.* *Ilex paraguariensis* extract are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and

mammalian cell cytotoxicity. **Life Sciences**. Elmsford, v. 77, n.3, p. 343-358, June 2005.

BOCHI, V. **Otimização de uma formulação de fishburgers de jundiá (Rhamdia quelen) visando o aproveitamento de subprodutos da filetagem e do processamento de frutas**. 2007 Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

BONAN, K.; COHEN, Y. Comer com inteligência. La revolucion de la medicina ortomolecular que descubre los alimentos esenciales para cada individualidad e estilo de vida. Ed. Sudamericana, Buenos Aires, Argentina, 1992.

BONTEMPO, M. **Mel. Uma vida doce e saudável**. São Paulo: Alaúde Editorial, 2008. 149 p.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**, v. 28, p. 25 – 30, 1995.

BRASIL. Portaria n° 1004 – Regulamento Técnico: “Atribuição de função de aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 – carnes e produtos cárneos”. Ministério da Agricultura, Diário Oficial de 14 de dezembro de 1998.

BRASIL. Instrução Normativa n°20 de 21 de julho de 1999. Anexo - **Métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes - sal e salmoura**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1999.

BRASIL. Instituição Normativa n°4 de 31 de março de 2000. Anexo – **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Lingüiça**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2000. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7778>. Acesso em: 04 de novembro de 2009.

BRASIL. Resolução RDC n°12 de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Ministério da Saúde, 2001. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144>. Acesso em: 04 de novembro de 2009.

BRASIL. Instrução Normativa n°62 de 26 de agosto de 2003. Anexo - **Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle dos produtos de**

origem animal e água. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, 2003.

BUCKLEY, D. J., MORRISSEY, P. A.; GRAY, J. I. Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 122–3130, 1995.

BURATTI, S., et al., Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. **Food Chemistry**, v. 97 (4), p. 725-731, 2006.

BURATI, S., et al. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. **Talanta**, v. 71, p. 1387-1392, 2007.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee products. **Food Chem. Toxicol**, v. 36, p. 346-363, 1998.

BURIOL, L. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**. v. 32. p. 296 – 302, 2009.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chemistry and Toxicology**, v.36, p.347–363, 1998.

BUSATTA, C. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v.25, p.207–211, 2008.

CABRAL, I.S.R., et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**. v. 32, n. 6, 1523-1527, 2008.

CAMPAGNOL, P. C. B. **Cultura starter produzida em meio de cultura de plasma suíno e antioxidante natural na elaboração de salame.** 2007. 74f. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

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

CHAILLOU, L.L.; HERRERA, H. A.; MAIDANA, J. F. Estudio del propoleos de Santiago de estero, Argentina. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. v. 24, p. 11-15. 2004.

CRACKEL, R.L. et al., Some further observations on the TBA test as an index of lipid oxidation in meats. **Food Chemistry**, v. 28 (3), p. 187-196, 1988

CRANE, E. **The past and present importance of bee products to man**. Plenum Press, New York, 1997. p. 1-14.

COULTATE, T.P. Food :the Chemistry Of Its Components. Ed Paperback, 2002

DINIZ, T.C.P.; MADEIRA, V.M.C.; ALMERIDA, L.M. Action of phenolic derivatives as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavenges. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 315, p. 161 – 169, 1994.

DOBROWOLSKI, J.W., et at. **Antibacterial, antifungal, antimoebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products**. Journal of Ethnopharmacology, Ireland, 35, p.77-82, 1991.

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

FAO. **Value-added products from beekeeping**. FAO Agricultural Services Bulletin. Roma, FAO, 1996.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. São Paulo, SP. Atheneu. V. 2. 4ª Ed. 2005. 268 p.

FIGUEIREDO, P.S.F. et al. Avaliação do perfil antioxidante da quercetina e quercetina – Cu (II) e sua relação com logP. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia. São Paulo – SP , de 19 a 22 de maio de 2006.

FENNEMA, O.R. Química de los alimentos. 2ªed, Acribia: Zaragoza, 2000, 1258p.

FRANKEL, E, N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. **Food Chemistry**. v. 57, p. 51-55, 1996.

FRANKEL, E. N. **Lipid oxidation**. Dundee, Scotland: The Oily Press Ltd. 1998.

FERREIRA, A.C.B. et al. Composição centesimal e aceitação de lingüiça elaborada com reduzido teor de gordura e adicionada de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p. 209-214, 2009.

GOMEZ-CARAVACA, A.M. et al. Advances in the analysis fo phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1220-1234, 2006.

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

GHISALBERTI, E. L. **Própolis: a review**. Bee World, 60, p. 59-84, 1979.

GIRAL, T.; MENENDEZ, V.; RUIZ, M. Propoleos en el tratamiento de afecciones dermatológica. Experiências de un triênio. **La Habana**, Cuba, 1991.

GRAY, J. I.,; PEARSON, A. M. **Rancidity warmed over flavour**. In A. M. Pearson, & T. R. Dutson (Eds.), *Advances in meat research, restructured meat and poultry products*. New York: Van Nostrand Reinhold Company, v. 3. p. 221–269, 1987.

HALLIWELL, B.; RAFTER, J.; JENNER, A. **Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?**. American Journal of Clinical Nutrition, v. 81, p. 268-275, 1995.

HALLIWELL, B. **The antioxidant paradox**. The Lancet, v. 355, p. 1179-1180, 2000.

HAN, S.K.; PARK, H.K. Accumulation of thiobarbituric acid-reactive substances in cured pork sausages treated with propolis extracts. **Journal Sci. Food Agric.**, v. 82, p. 1487-1489, 2002.

HAYDAK, M.H. Honey bee nutrition. **Annal Review of Entomology**, v. 15, p. 143-156, 1970.

HORAX R. *et al.* **Effect of gamma irradiation and storage time on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in chicken breast meat infused with**

antioxidants and select plant extracts. The Food Safety Consortium Annual Meeting, Manhattan, Oct 13-15, 1999.

HULIN, V. et al. **Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes.** Sciences des Aliments, v. 18, p.563-582, 1998.

IBANEZ, E.; CIFUENTES, A. New analytical techniques in food science. **Crit. Rev. Food Sci.**, vol. 41, p.413-450, 2000.

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

KAHL, R. e HILDEBRANDT, A.G. Methodology for studying antioxidant activity and mechanisms of action of antioxidants. **Food Chem. Toxicol** .,v.24, p.1007–1014. 1986.

KALOGEROPOULOS, N. et al. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**, v.116, p.452–461, 2009.

KAMDEM, S. S. et al. Shelf-life and safety characteristics of Italian Toscana traditional fresh sausage (Salsiccia) combining two commercial ready-to-use additives and spices. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 421-429, 2007.

KARPINSKA M.; BOROWSKI J.; DANOWSKA-OZIEWICZ M. The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. **Food Chemistry**, v. 72, n. 1, p. 5–9, 2001.

KOO, H., GOMES et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica Montana against oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, v. 45, p.141-148, 2000

KRING, U.; BERGER, R. G. Antioxidant activity of some roasted foods. **Food Chemistry**. v. 72, p. 223-229, 2001.

KUMAGAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAGAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographics origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329-339, 2004.

KUMAR, N.; SINGHAL, O. Cholesterol oxides and atherosclerosis: a review. **Journal of Science Food and Agriculture**, v.5, p.497-510, 1991.

LAPPE, R. Influência da utilização do extrato hidroalcoólico de própolis sobre o desenvolvimento de fungos e características físico-químicas e sensoriais do salame tipo Italiano. 2004. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

LAWRIE, R. A. **Meat science**. Lancaster: Technomic. 338 p. 1998.

LEE, L. CHEN, Y. CHOU, C. Antibacterial activity of propolis against *staphylococcus aureus* **International Journal of Food Microbiology**, Taipei, v. 102, n.2, p. 213-220, 2005

LYON, B. G. et al. Sensory analysis and thiobarbituric acid values of precooked chicken patties stored up to three days and reheated by two methods. **Poultry Science**. v. 67, p. 736-742, 1988.

LU, L.; CHEN, Y. & CHOU, C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 213 – 220, 2003.

MAMBRO, V.M.D. et al. Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 262, p. 93-99, 2003.

MARCUCCI, M. C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, p.83–99, 1995

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

MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

MEDEIROS, I. A., et al., Flavonóides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-O- β -L-ramnopiranosídeo, **Rev. bras. Farmacogn**, v.15 (1), p. 23-29, 2005

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

MENI, F. et al. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **Journal of ethnopharmacology**, vol 105, n. 1-2, p. 95-95, 2006.

Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAA). Secretaria de Defesa Agropecuária. Anexo VII. Instrução Normativa Nº 3, de 19 de janeiro de 2001.

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

MOHAMMADZADEH, S. et al. Antioxidant power of Iranian propolis extract. **Food Chemistry**, v. 103, p. 729-733, 2007.

MOREIRA, E.A.M.; SHAMI, N.J.I.E. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**. v. 17, n.2, p. 227-236, abr./jun., 2004.

MOREIRA, L. et al. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of própolis samples from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.3482-3485, 2009.

NAGAI, T.; INOUE, R. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. **Food Chemistry**, v. 84, p. 181-186, 2004.

NAGAI, T. et al. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. **Food Chemistry**, v. 75, p. 237-240, 2001.

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

NEVES, L.C. et al. Determinação de atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, junho de 2009.

NYCHAS, G.J.E. et al. Chemical changes in stored meat. **The Microbiology of Meat and Poultry**. p. 288-326, 1998.

OHSHIMA H. et al. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and anion. **Free Radical Biology and Medicine**, Lyon, v.25, n.9, p. 1057-1065, Dec. 1998.

OLIVO, R. et al. Dietary vitamin E inhibits poultry PSE and improves meat functional properties. **Journal Food Biochemistry**. V.25, p.271-283, 2001.

O'NEILL, L.M. et al. Comparison of effects of dietary olive oil, tallow and vitamin E on the quality of broiler meat products. **British Poultry Science**, v.39, p.365-371, 1998.

RHEE, K. S. et al. Lipid oxidation potential of beef, chicken and pork. **Journal of Food Science**, v.61,p. 8- 12, 1996.

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

PAPAY, V.; TOHT, L. e SOLTESZ, M. Las actividades farmacológicas de las fracciones y los compuestos aislados del propóleos húngaro e las yemas del lamo (*Populi gemma*). Ed. Apimondia, Romênia, 1985, p. 491-495.

PAPADIMA, S.N.; BLOUKAS, J.G. Effect of fat level and storage conditions on quality characteristics of Greek tradicional sausages. **Meat Science**. p. 103-113, 1999.

PARADISI, F.; CORTI, G.; SBARAGLI, S., et al. Effect of antibiotic pretreatment on resistance. **Seminars in respiratory infections**. v. 17, n. 3, p.240-5, 2002.

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.

PEREIRA, A.; SEIXAS, F.; NETO; F. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. Revista **Química Nova**. V.25, n^o2, jan/jul 2001.

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

PRANDL, O. et al. **Tecnología e higiene de la carne**. Ed.Acribia, 1994, p. 84.

PRATT, D.E.; BIRAC, P.M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **Journal Food Sci.**, v. 29, p. 1720-1722, 1979.

RHEE, S.G., Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. **Science**, v. 244, p. 546 – 550, 1989

RISCH, S.; CHI-TANG, H. **Spices. Flavor Chemistry and Antioxidant Properties**. New Orleans, Louisiana, 1996, p. 253.

RODRIGUEZ – ESTRADA, M. **Effect of different cooking methods on soe liphid and protein components of Hamburgers**. *Meat Science*, 45, 365 – 375, 1997.

ROMERO, N. et al. Effect of α -tocopherol, α -tocotrienol and Rosa mosqueta shell extract on the performance of antioxidant-stripped canola oil (*Brassica* sp.) at high temperature. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 383–389, 2007.

SALATINO, A. et al. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v.2, n.1, p. 33-38, 2005.

SHELLER, S.; WILCZOK, T. & IMILSKI, S. Free radical scavenging by ethanolic extracts of propolis. **International Journal of Radiation Biology**, v. 57, p. 461- 465, 1990.

SECO, J. M., et al. The Assignment of Absolute Configuration by NMR, **Chem. Ver**, v. 104, n.1, p. 117-118, 2004

SEABRA, L.M.A.J. et al. Fécula de mandioca e farinha de aveia como substitutos de gordura na formulação de hambúrguer de carne ovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.22, n.3, p.244-248, 2002.

SEBRANEK, J.G. Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. **Meat Science**, v.69, p. 289–296, 2005.

SHAHIDI F.; HONG C. Role of metal ions and heme pigments in autoxidation of heat-processed meat products. **Food chemistry**, v. 42(3), p. 339-346, 1991.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n.1, p.67-103,1992.

SHIMAZAWA, M., et al., Neuroprotection by Brazilian Green Propolis against *In vitro* and *In vivo* Ischemic Neuronal Damage. **Oxford Journals**, eCAM 2005;2(2)201–207

SIGLETON, 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 in Enzimology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

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, p. 431-435, 2006.

SILVA, M.S.A., et al. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. vol.18, n.2, pp. 236-240, 2008.

SOUZA, M.A. **Casca de batata inglesa (*Solanum tuberosum*) na proteção antioxidante da carne de frango**. 2006. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

STOCKER, A. et al. Trace and mineral elements in royal jelly and homeostatic effects. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 19, p. 183-189, 2005.

TAPIERO, H. et al. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomedecine & Pharmacotherapy**, v.56, n.4, p. 200-207, 2002.

TEIXEIRA, E. W., et al. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Propolis Samples. **eCAM**, P. 1-9, doi:10.1093/ecam/nem177. Advance Access published on January 31, 2008.

TERRA, N.N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo, Ed. Unisinos, 1998. 216p.

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

TORRES, E.A.F.S.; OKANI, E.T. Teste de TBA: ranço em alimentos. **Revista Nacional da Carne**, n.243: p.68-78, 1997.

TSAKOFF, T. Study of the local anaesthetic characterists of própolis and the their effect in operations on sheep and dogs. **Apimondia**, Bucharest, p. 67-71, 1978.

YUN, S. S. et al. Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 80, n 2-3, p. 155-161, 2002.

YUN, S. S. et al. Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. **Cancer letters**, v. 175, n. 1, p. 53-61, 2002.

WEBER, G. M; ANTIPATIS, C. Qualidade da carne suína e dieta de vitamina E. In: II CONFERÊNCIA INTERNACIONAL VITUAL SOBRE A QUALIDADE DE CARNE SUÍNA, 2., 2001, Suíça. **Anais Eletrônicos...** Disponível em: <http://www.conferencia.uncnet.br/pork/seg/pal/anais01p2_weber_pt.pdf>. Acesso em: 15 out 2009.

WESTON, R.J. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. **Food Chemistry**, v. 71, p. 235-239, 2000.

VALDÉS, G. Determinacion preliminar de la calidad antibacteriana de dos muestras de propóleo de Chile. **La Habana**, Cuba, 1996.

VELIOGLU, Y. et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

XIONG, Y. Impacts of oxidation on muscle protein functionality. **Proceedings of the Reciprocal Meat Conference**, v.49, p.79-86, 1996.