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

Caroline Pagnossim Boeira

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS DE MARCELA (*Achyrocline satureioides)* E CAPIM-LIMÃO *(Cymbopogon citratus)* E APLICAÇÃO EM LINGUIÇA FRESCAL

Santa Maria, RS
2018

Caroline Pagnossim Boeira

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS DE MARCELA (*Achyrocline satureioides)* E CAPIM-LIMÃO *(Cymbopogon citratus)* E APLICAÇÃO EM LINGUIÇA FRESCAL

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de concentração 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. Pós Dr. Nelcindo Nascimento Terra

Co-Orientadora: Dra. Claudia Severo Rosa

Santa Maria, Brasil.
2018

Boeira, Caroline Pagnossim
Avaliação do potencial antioxidante e antimicrobano de extratos de marcela (Achyrocline satureioides) e capim limão (Cymbopogon citratus) e aplicação em linguiça fresca / Caroline Pagnossim Boeira.- 2018.
100 p.; 30 cm

Orientador: Nelcindo Nascimento Terra
Coorientadora: Claudia Severo Rosa
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2018

1. Antioxidante natural 2. Linguiça de frango 3. Oxidação Lipídica 4. Marcela 5. Capim-limão I. Terra, Nelcindo Nascimento II. Rosa, Claudia Severo III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2018
Todos os direitos autorais reservados a Caroline Pagnossim Boeira. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: carolinepagnossim@hotmail.com

Caroline Pagnossim Boeira

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS DE MARCELA (*Achyrocline satureioides)* E CAPIM-LIMÃO *(Cymbopogon citratus)* E APLICAÇÃO EM LINGUIÇA FRESCAL

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de concentração 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**

Aprovado em 1 de março de 2018

Claudia Severo da Rosa, Drª (UFSM)
(Presidente/Co-Orientadora)

Mari Silvia Rodrigues de Oliveira, Drª (UFSM)

Silvana Maria Michelin Bertagnolli, Drª.(UNIFRA)

Santa Maria, RS

2018

AGRADECIMENTOS

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

A minha família, em especial meus pais *Gilmar e Rosani*, e meus padrinhos que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e participaram dessa conquista me ajudando e incentivando em todos os momentos.

A todos os meus familiares e amigos que torceram por mim ao longo desta jornada.

Agradeço, especialmente, a uma pessoa que entrou em minha vida durante esta etapa, meu namorado *Maurício Farias Alves*, que em todos os momentos se mostrou companheiro e amigo, me apoiando em todos os desafios.

Ao meu orientador professor Dr. *Nelcindo Nascimento Terra*, e a minha co-orientadora professora Dra. *Claudia Severo da Rosa*, pela amizade, apoio e empenho durante a execução este trabalho.

Aos funcionários do departamento de Ciência e Tecnologia de alimentos, em especial *Magé, Marialene, Moises, Rosângela, Liana,* e *Ricardo*, que conheci, convivi e me tornei amiga nessa caminhada.

Aos meus *colegas da pós-graduação* por ter dividido da amizade e conhecimento. Agradeço a todos que contribuíram de alguma maneira para a elaboração desta dissertação.

Agradeço as meninas que me ajudaram na execução deste trabalho *Marcela Soquetta, Bruna Nichelle, Vanessa Batista* e *Gabriela Viegas*, pelo auxílio durante as análises e elaboração do produto.

A Deborah Flores pela ajuda incansável no laboratório durante as análises, companheira de todas as horas, obrigada pelo comprometimento com o trabalho, sem você não teria sido possível.

A minha amiga e companheira desta jornada, *Natiéli Piovesan*, os meus sinceros agradecimentos por todo auxílio durante essa pesquisa, serei eternamente grata pelos teus ensinamentos.

As professoras integrantes da banca Dra. *Mari Silvia Rodrigues de Oliveira* e Dra. *Silvana Maria Michelin Bertagnolli* pelas considerações e sugestões essenciais para essa dissertação.

A CAPES pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de Mestrado.

Muito obrigada a todos que de alguma maneira contribuíram para realização dessa conquista.

RESUMO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBANO DE EXTRATOS DE MARCELA (*Achyrocline satureioides)* E CAPIM-LIMÃO *(Cymbopogon citratus)* E APLICAÇÃO EM LINGUIÇA FRESCAL

AUTORA: Caroline Pagnossim Boeira
ORIENTADOR: Dr. Nelcindo Nascimento Terra
CO-ORIENTADORA: Dra. Claudia Severo da Rosa

A linguiça é um produto cárneo que devido ao seu alto teor de gordura, a natureza das matérias-primas e a falta de tratamento térmico, está propensa à deterioração, a oxidação lipídica e a contaminação microbiana. Diversos estudos vêm sendo realizados na área de alimentos visando o desenvolvimento de extratos vegetais que exibam propriedades antimicrobianas e/ou antioxidantes. O presente estudo teve por objetivo obter extratos de marcela (*Achyrocline satureioides)* e capim-limão (*Cymbopogon citratus*), avaliar a capacidade antioxidante e antimicrobiana, bem como aplicar o extrato de cada erva com maior atividade antioxidante em linguiças de frango, visando o seu potencial antioxidante natural. Os extratos foram obtidos pelo método convencional e ultrassom, em diferentes temperaturas (20 °C, 40 °C e 60 °C), durante 20 minutos. Nos extratos foram realizadas as análises de fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante pelos métodos DPPH, FRAP, ORAC e atividade antimicrobiana. O extrato de capim-limão obtido pelo método convencional a 60 °C, e o extrato de marcela obtido pelo método ultrassom a 60 °C foram os que apresentaram as melhores características antioxidantes e atividade antimicrobiana, diferentes concentrações de cada extrato (0,5% e 1,0%) foram aplicados em linguiças de frango. As análises realizadas nas linguiças foram: composição centesimal, pH, atividade de água, cor, oxidação lipídica, análises microbiológica e sensorial. Os resultados obtidos na composição centesimal mostraram que as linguiças estão de acordo com o Padrão de Identidade e Qualidade do Produto. As análises microbiológicas para *Staphylococcus* coagulase positiva, Coliformes a 45 ºC, *Samonella sp.* e *Clostridium sulfito redutor* dos produtos estão de acordo com a RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. O pH e atividade de água das linguiças de frango apresentaram um leve aumento ao final do tempo de armazenamento. O parâmetro b* mostrou que os tratamentos T1 e T2 foram os que apresentaram maior oxidação lipídica concordando com os dados de TBARS. Ao fim dos 42 dias de armazenamento, os valores de TBARS para o tratamento com adição de antioxidante sintético foi de 0,99 mg de malondialdeído (MDA) /kg enquanto que os tratamento adicionados de extrato de marcela e capim-limão mantiveram-se abaixo de 0,4 mg de MDA/kg. A linguiça adicionada de 1,0% de capim-limão foi a que apresentou menor oxidação lipídica ao longo dos 42 dias de armazenamento. As características sensoriais foram mantidas, demonstrando boa aceitabilidade pelos provadores. Os resultados do *check-all-which-apply* (CATA) mostraram que os tratamentos com 1,0 % de extrato de marcela e 0,5 e 1,0%, de extrato de capim-limão foram os grupos que receberam os melhores atributos sensoriais, sendo os mais aceitos.

Palavras-chave: Antioxidante natural. Linguiça de frango. Oxidação Lipídica. Capim-limão. Marcela.

ABSTRACT

EVALUATION OF ANTIOXIDANT POTENTIAL AND ANTIMICROBAN FROM MARCELA EXTRACTS (*Achyrocline satureioides*) AND LEMON CAPIM (*Cymbopogon citratus*) AND APPLICATION IN FRESCAL LANGUAGE

AUTHOR: Caroline Pagnossim Boeira
ADVISOR: Dr. Nelcindo Nascimento Terra
CO-ADVISOR: Dr. Claudia Severo da Rosa

Sausage is a meat product which, because of its high fat content, the nature of the raw materials and the lack of heat treatment, is prone to deterioration, lipid oxidation and microbial contamination. Several studies have been carried out in the area of food for the development of plant extracts that exhibit antimicrobial and / or antioxidant properties. The objective of the present study was to obtain extracts of marcela (*Achyrocline satureioides*) and lemon grass (*Cymbopogon citratus*), to evaluate antioxidant and antimicrobial capacity, as well as to extract the extract of each herb with higher antioxidant activity in chicken sausages, aiming its natural antioxidant potential. The extracts were obtained by conventional method and ultrasound, at different temperatures (20 °C, 40 °C and 60 °C) for 20 minutes. In the extracts were carried out the analyzes of total phenolics, total flavonoids, antioxidant activity by DPPH, FRAP, ORAC and antimicrobial activity. The extract of lemon grass obtained by the conventional method at 60 °C and the extract of marcela obtained by the ultrasound method at 60 °C were the ones that presented the best antioxidant characteristics and antimicrobial activity, being thus different concentrations of each extract (0,5% and 1,0%) were applied in chicken sausage. The analyzes performed in the sausages were: centesimal composition, pH, water activity, color, lipid oxidation, microbiological and sensorial analyzes. The results obtained in the centesimal composition showed that the sausages are in accordance with the Standard of Identity and Product Quality. Microbiological analyzes for *Staphylococcus* coagulase positive, Coliformes at 45 °C, *Samonella sp* and *Clostridium* sulfite reductant of the products are in accordance with RDC n° 12 of January 2, 2001. The pH and water activity of the sausages of chicken presented a slight increase at the end of storage time. The parameter b * shows that T1 and T2 treatments presented the highest lipid oxidation in agreement with TBARS data. At the end of the 42 days of storage, the TBARS values for the treatment with addition of synthetic antioxidant were 0.99 mg of malondialdeído (MDA) / kg while the added treatments of marcela extract and lemon grass remained below 0, 4 mg of MDA / kg. The sausage added was 1,0% of lemon grass which presented lower lipid oxidation over the 42 days of storage. The sensorial characteristics were maintained, demonstrating good acceptability by the tasters. The results of check-all-which-apply (CATA) showed that the treatments with 1,0% of marcela extract and 0,5 and 1,0% of lemon grass extracts were the groups that received the best sensory attributes, being the most accepted.

Keywords: Natural antioxidant. Chicken sausage. Lipid Oxidation. Lemon grass. Marcela.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1: Fenólicos totais, flavonoides totais, capacidade inibitória (IC_{50}), capacidade de redução de ferro (FRAP) e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) dos extratos obtidos por diferentes métodos e temperaturas de extração. 35

ARTIGO 2

Tabela 1: Ingredientes utilizados nas formulações das linguiças de frango.....57
Tabela 2: Teor de fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos de capim-limão obtidos por diferentes métodos e temperaturas de extração. 58
Tabela 3: Capacidade inibitória (IC_{50}), capacidade de redução de ferro (FRAP), capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) e atividade antioxidante máxima (DDPH) dos extratos obtidos por diferentes métodos e temperaturas de extração. 59

ARTIGO 3

Tabela 1: Ingredientes utilizados nas formulações das linguiças de frango.....67
Tabela 2: Composição centesimal das amostras de linguiça de frango refrigeradas durante o período de armazenamento a 4 ºC (±1 ºC). 72
Tabela 3: - Valores médios para a luminosidade (L*), cor vermelha (a*) e cor amarela (b*) das amostras de linguiça de frango durante o período de armazenamento a 4 ºC (±1 ºC).....77
Tabela 4: – Médias das notas relativas as características sensoriais (cor, odor, sabor, textura e aparência global) das amostras de linguiça de frango refrigeradas ao décimo dia de armazenamento a 4 ºC (±1 ºC). 79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de oxidação lípídica.....15
Figura 2: Reação de oxidação lipídica em produtos cárneos.....16

ARTIGO 1

Figura 1: Percentual de atividade antioxidante máxima (%) dos extratos de marcela, obtidos por diferentes métodos e temperaturas de extração.....36

ARTIGO 2

Figura 1: Valores médios da contagem de microrganismos psicotróficos totais, das amostras de linguiça de frango, durante o período de armazenamento a 4 ºC (±1 ºC).....60
Figura 2: Valores médios da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais das amostras de linguiça de frango, durante o período de armazenamento a 4 ºC (±1 ºC). 61

ARTIGO 3

Figura 1: Valores médios de pH das amostras de linguiça de frango durante o período de armazenamento a 4 ºC (±1 ºC). 73
Figura 2: Valores médios de atividade de água (Aa) das amostras de linguiça de frango durante o período de armazenamento a 4 ºC (±1 ºC). 74
Figura 3: Valores médios de TBARS (mgMDA/kg de amostra) das amostras de linguiça de frango durante o período de armazenamento a 4 ºC (±1 ºC).....75
Figura 4: Médias das notas atribuídas a intenção de compra para as linguiças de frango refrigeradas armazenadas a 4ºC (±1 ºC) utilizando escala hedônica de 5 pontos. 80
Figura 5: Representação das amostras e os termos na primeira e segunda dimensões da análise de correspondência realizada em questões de dados check-all-which-apply (CATA). 81

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **11**
2 OBJETIVOS **13**
2.1 Objetivo Geral **13**
2.2 Objetivos Específicos **13**
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **14**
3.1 Linguiça frescal **14**
3.2 Oxidação lipídica **15**
3.3 Antioxidantes **17**
3.3.1 Antioxidantes sintéticos **17**
3.3.2 Antioxidantes naturais **18**
3.4 Marcela **19**
3.5 Capim-limão **20**
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS **22**
4.1 Artigo 1: Extração assistida por ultrassom para obtenção de compostos bioativos, antioxidantes e antimicrobianos de marcela **22**
4.2 Artigo 2: Extração de compostos bioativos de capim-limão e avaliação da atividade antimicrobiana em produto cárneo **37**
4.3 Artigo 3: Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de linguiças de frango refrigeradas adicionadas de extratos de marcela (*Achyrocline satureioides*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) como antioxidantes **62**
5 DISCUSSÃO **86**
6 CONCLUSÃO **90**
REFERÊNCIAS **92**

1 INTRODUÇÃO

A linguiça é um produto cárneo industrializado, que tem feito parte do hábito alimentar da população brasileira tendo o seu consumo aumentado significativamente, pois, trata-se de um produto de fácil preparo e apresenta características sensoriais e nutricionais (alto teor de proteínas, lipídios, e minerais) que agradam o consumidor (QUEIROZ et al., 2005). Porém em virtude do seu alto teor de gordura, a natureza das matérias-primas e a falta de tratamento térmico, tal produto é propenso à deterioração, a oxidação lipídica e a contaminação microbiana (GEORGANTELIS et al., 2007).

A oxidação lipídica é um importante fator limitador da qualidade da carne e de produtos cárneos e tem interferido na aceitabilidade dos consumidores (MARANGONI; MOURA, 2011). Os produtos da oxidação lipídica são indesejáveis, não somente pela produção de odores e *flavours* desagradáveis, 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 (CAPRILES; SOARES; ARÊAS, 2009).

Os antioxidantes são definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como substâncias que retardam ou inibem alterações oxidativas em alimentos (BRASIL, 1997). Segundo Prado (2009) os antioxidantes também são classificados quanto a sua origem, naturais ou sintéticos, e para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde.

A marcela (*Achyrocline satureioides*) é uma planta medicinal utilizada no Brasil através de infusões para o alivio de cólicas abdominais, dores de cabeça e distúrbios estomacais. Possui propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antinflamatórias. O alto conteúdo de compostos polifenólicos, na maioria flavonoides, e de diferentes ácidos fenólicos como o caféico e clorogênico nas partes aéreas desta planta, tem despertado o interesse pelo estudo das suas propriedades antioxidantes (BLASINA et al., 2009).

O capim-limão (*Cymbopogon citratus*), também conhecido por erva cidreira, capim-cidreira ou *lemongrass*, é uma planta originária da Ásia e é muito cultivada em países tropicais. No Brasil, seus chás e extratos são utilizados na medicina popular como digestivos, antitussígenos, antigripais, analgésicos, antitérmicos, anti-inflamatórios das vias urinárias, diuréticos, antiespasmódicos, antialérgicos, entre outros (NEGRELLE; GOMES, 2007). Em diversos sistemas de extração o capim-limão ou seus compostos específicos (ex. citral, β-

mirceno e geraniol) têm apresentado atividade antimutagênica, antioxidante e anticarcinogênica (RABBANI; DEVI; KHANAM; ZAHRA, 2006).

Com base no exposto, o alto conteúdo de bioativos nos extratos de marcela (*Achyrocline satureioides)* e capim-limão (*Cymbopogon citratus)*, as propriedades antioxidantes de ambas, a boa disponibilidade na flora silvestre brasileira e o baixo custo de obtenção contribuem para utilização destas plantas como antioxidantes em produtos cárneos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Extrair compostos bioativos de marcela (*Achyrocline satureioides)* e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e aplicá-los em linguiças de frango.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos de marcela (*Achyrocline satureioides*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*), através do método convencional e do método de ultrassom;
- Quantificar os compostos fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos obtidos;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos pelos métodos de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) e FRAP (Poder antioxidante de redução de ferro);
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato que apresentar maior atividade antioxidante;
- Elaborar linguiças de frango adicionadas de diferentes concentrações de extratos de marcela e capim-limão;
- Determinar a estabilidade lipídica, físico-química e microbiológica das linguiças durante a vida de prateleira;
- Avaliar sensorialmente as formulações das linguiças de frango.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LINGUIÇA FRESCAL

Embutidos, como linguiças, são definidos como alimentos condimentados contidos em envoltório natural ou artificial, cuja elaboração emprega carne de bovinos, suínos ou aves, bem como suas vísceras, podendo ser cozido ou não, curado, maturado e dessecado (BRASIL, 2000).

A linguiça do tipo frescal destaca-se dentre os produtos cárneos embutidos por sua aceitação e comercialização. O processo de produção utiliza carnes de animais de açougue, adicionadas ou não de tecidos adiposos, e o processamento pode ocorrer em estabelecimentos de micro, pequeno, médio e grande porte. Ao processo, agregam-se aditivos utilizados para melhorar as características sensoriais do produto (OLIVEIRA; ARAÚJO; BORGO, 2005). De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (R.I.I.S.P.O.A.), para embutidos não submetidos ao cozimento, como é o caso da linguiça frescal, é permitida a adição de água ou gelo até o máximo de 3% na formulação, calculada sobre o total dos componentes e com a finalidade de facilitar a trituração e homogeneização da massa (BRASIL, 1952).

Sua obtenção requer uma série de etapas de manipulação, o que eleva as possibilidades de contaminação por diversas espécies de micro-organismos o que pode comprometer a qualidade microbiológica do produto final. Diversas podem ser as fontes de introdução destes agentes na cadeia alimentar, como condições inadequadas de abate e evisceração, nas quais as carcaças podem ser contaminadas por enterobactérias presentes no trato gastrintestinal (BORCH et al., 1996; TUTENEL et al., 2003).

A qualidade do produto elaborado reflete de forma clara uma série de fatores envolvidos no processo, como a qualidade da matéria- prima empregada, os ingredientes utilizados, os colaboradores envolvidos na produção, bem como equipamentos e utensílios, podem ser importantes fontes de contaminação (CHEVALLIER et al., 2006). Devido ao alto teor de gordura, a natureza das matérias-primas e a falta de tratamento térmico, a linguiça frescal é propensa à deterioração, a oxidação lipídica e a contaminação microbiana (GEORGANTELIS et al., 2007).

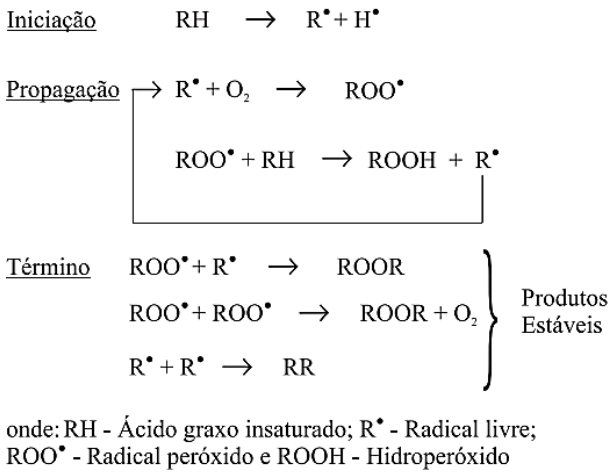
A linguiça apresenta, como características físico-químicas, umidade máxima de 70%, gordura máxima de 30% e proteína mínima de 12% (BRASIL, 2003). O processo requer adição de sais de cura, recurso que permitirá ao alimento produzido em escala industrial

atingir os parâmetros característicos de qualidade sensorial como sabor, cor, aroma e textura e a preservação do produto (OLIVEIRA; ARAÚJO; BORGO, 2005).

3.2 OXIDAÇÃO LIPÍDICA

A oxidação lipídica é uma das principais alterações que acometem as carnes e derivados, em razão da composição rica em lipídios e íons ferro, a utilização de processos como cocção e moagem, além do uso de cloreto de sódio, um conhecido catalisador desta reação (ROCHA et al., 2002). Segundo Gray (1996) o desenvolvimento da rancidez oxidativa baseia-se no surgimento de radicais livres, espécies químicas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados, que podem ser gerados durante o metabolismo normal das células ou resultantes da ação de iniciadores, como a luz ou íons metálicos. O mecanismo da oxidação lipídica está demonstrado na Figura 1.

Figura 1: Mecanismo de oxidação lípidica



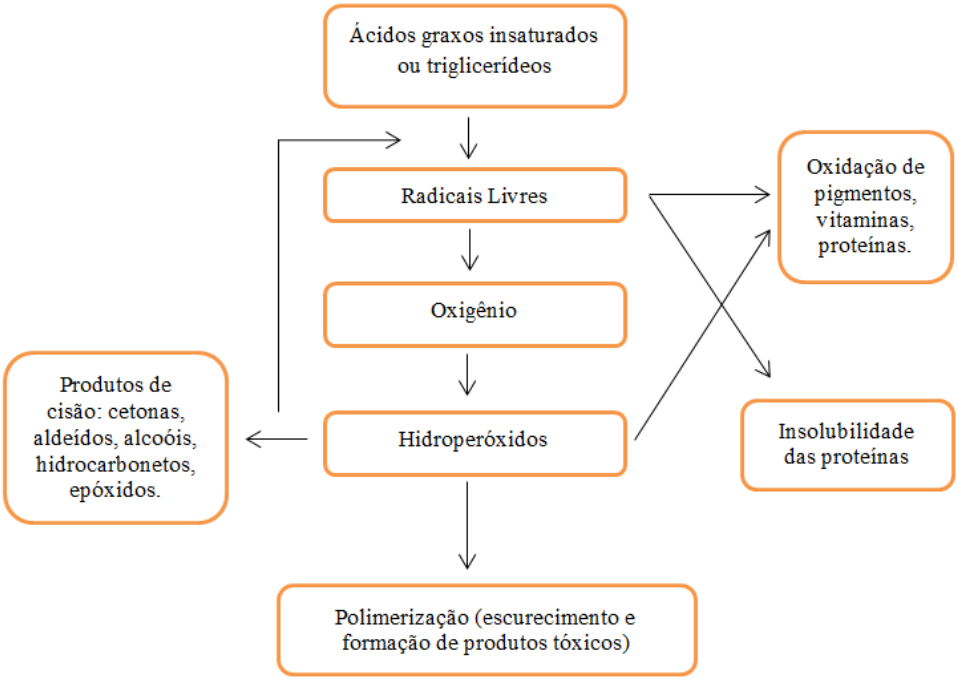
Fonte: Ramalho e Jorge (2006)

Os lipídios são constituídos por uma mistura de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias. A maior parte destes constituintes é oxidável em diferentes graus, sendo que os ácidos graxos insaturados são as estruturas mais susceptíveis ao processo oxidativo (COSGROVE, 1987).

O resultado das reações oxidativas nos alimentos é o surgimento de compostos oxigenados responsáveis pelas desagradáveis características organolépticas, conhecidas popularmente como ranço, além do desenvolvimento de substâncias tóxicas, como a acroleína, malonaldeído (MDA) e os óxidos de colesterol (ROCHA et al., 2002).

Existem diferentes métodos para quantificar a oxidação lipídica. Em carnes e produtos cárneos o mais usual é o teste de TBARS, devido à sua simplicidade e rapidez. Este teste quantifica o malonaldeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo (OSAWA; FELÉCIO; GONÇALVES, 2005).

Figura2: Reação de oxidação lipídica em produtos cárneos.



Fonte: Jadhav et al., 1996.

Visto que os radicais livres causam danos oxidativos aos lipídeos e proteínas o que pode ocasionar desagradáveis características organolépticas em produtos alimentícios, presume-se que a utilização de antioxidantes capazes de neutralizar os radicais livres possa ter um papel importante na prevenção destas alterações (HARBORNE e WILLIANS, 2000).

A preocupação constante de proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade levou à adoção de medidas que permitem limitar a oxidação durante as fases de processamento e armazenamento dos produtos. O desenvolvimento do processo oxidativo pode ser inibido por meio de alternativas como embalagens à vácuo ou atmosfera modificada, e o uso de substâncias antioxidantes (ROCHA et al., 2003).

A adição de compostos antioxidantes é uma prática eficiente, razão que justifica o atual interesse pela pesquisa de novos compostos com capacidade antioxidante. O baixo custo de obtenção, facilidade de emprego, eficácia, termo-resistência, "neutralidade" organoléptica

e ausência reconhecida de toxicidade, são premissas para a sua seleção e utilização a nível industrial (CASTERA-ROSSIGNOL; BOSQUE, 1994).

3.3 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como substâncias que retardam ou inibem alterações oxidativas em alimentos (BRASIL, 1997). Mesmo em pequenas quantidades eles podem minimizar a oxidação do substrato, no entanto, para que sejam efetivos, os compostos necessitam serem adicionados o mais cedo possível durante o processamento, (SIES & STAHL, 1995), pois não são capazes de reverter a oxidação de produtos já rancificados (CAMPOS & TOLEDO, 2000).

Os compostos com ação antioxidante atuam evitando o início ou bloqueando a propagação das reações de oxidação em cadeia de diferentes modos. Os antioxidantes também são classificados quanto a sua origem, naturais ou sintéticos, e para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde (PIETTA, 2000).

3.3.1 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

Os antioxidantes sintéticos são largamente utilizados na indústria de alimentos devido a sua alta capacidade antioxidante e notável atuação no retardo das reações de oxidação, por isso eles são alvos de estudos relacionados com sua eficiência e toxicologia (ARAÚJO, 2008).

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são os polifenóis, dentre estes o BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno), TBHQ (t-butil-hidroquinona) e PG (galato de propila), cuja ação consiste na rápida doação de um átomo de hidrogênio para o radical livre (HAMAMA e NAWAR, 1991). Desse modo, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres que possuem baixa reatividade graças à estabilização que a ressonância do anel aromático proporciona, não propagando ou promovendo as reações de oxidação (OMURA, 1995).

Em produtos cárneos utiliza-se o eritorbato de sódio e o ascorbato de sódio, com a função de acelerar a formação da cor e estabilizar a cor de carnes curadas com nitrito, em função de seu alto poder redutor. O eritorbato de sódio é o sal sódico do ácido eritórbico ou

ácido isoascórbico. Além da sua reação com o nitrito, apresenta por si só um forte efeito antioxidante quando aplicado em concentrações acima de 100ppm, todavia em concentrações mais baixas pode acelerar as reações oxidativas (ANGELINI, 2010).

Essas substâncias sintéticas são utilizadas como aditivos alimentares, pois tiveram o seu uso aprovado após investigações do comitê internacional de especialistas da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em aditivos alimentares *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) que comprovaram sua segurança dentro de um limite de ingestão diária aceitável (IDA) (TAKEMOTO; TEIXEIRA; GODOY, 2009).

Segundo Bauer (2001) o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto à inocuidade, demonstrando a possibilidade desses antioxidantes apresentarem alguma toxidez. Estudos demonstram que os antioxidantes sintéticos podem estar relacionados a implicações negativas, como efeitos mutagênicos e carcinogênicos (SOUZA, 2006). Por estes motivos, a salubridade dessas substâncias vem sendo questionada e em alguns países, seu uso já foi restrito. Esses fatos desencadearam a procura por novos antioxidantes, que sejam seguros e preferencialmente provenientes de fontes naturais (TERMENTZI; KEFALAS; KOKKALOU, 2006).

3.3.2 ANTIOXIDANTES NATURAIS

Os alimentos fornecem não somente nutrientes essenciais necessários para a vida, mas também compostos bioativos que promovem benefícios à saúde. Esse efeito tem sido atribuído, em grande parte, a propriedades biológicas ditas promotoras da saúde, tais como atividades antioxidante, antinflamatória e hipocolesterolêmica de vitaminas e de compostos fenólicos (SEIFRIED et al., 2007).

Os antioxidantes naturais compreendem uma vasta classe de compostos químicos, que atuam de diferentes maneiras na oxidação de lipídios, doando prótons (antioxidante primário), como os compostos fenólicos, e/ou quelando com catalisadores da reação de oxidação (sinergísticos), como os ácidos cítrico e ascórbico. Dentre os antioxidantes naturais mais utilizados destacam-se os ácidos fenólicos, tocoferóis e extratos de plantas, como sálvia e alecrim (RAMALHO; JORGE, 2006).

Esses compostos estão presentes em alimentos de origem vegetal, tais como frutas, verduras e alguns cereais (PEREIRA, 2009). São exemplos típicos, as classes dos fenóis,

ácidos fenólicos e seus derivados, flavonoides, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos, esteróis, entre outros (OLIVEIRA, 2009).

Diversas ervas e especiarias foram relatadas por possuírem atividades antioxidantes, sugerindo, inclusive, potencial benéfico à saúde humana. Há necessidade de aprofundar o campo de pesquisa relativo à identificação destes compostos e seus mecanismos de ação biológica. Essas considerações apontam a importância do estudo das plantas medicinais como antioxidantes naturais, de modo a minimizar os processos oxidativos (YANISHLIEVA et al., 2006; VIUDA-MARTOS et al., 2011).

A exigência do consumidor reforça o mercado potencial dos antioxidantes naturais, uma vez que existe grande desconforto de uma parcela da população em manter a aquisição e consumo de alimentos industrializados, cuja produção reconhecidamente envolva o emprego de substanciais quantidades de aditivos sintéticos (VALENTÃO et al., 2002; AMAROWICZ et al., 2004).

3.4 MARCELA

A marcela (*Achyrocline satureioides*) é uma planta medicinal utilizada no Brasil através de infusões para o alivio de cólicas abdominais, dores de cabeça e distúrbios estomacais. Possui propriedades antimicrobianas, antioxidantes e antinflamatórias (Figura 3). O alto conteúdo de compostos polifenólicos, na maioria flavonoides, e de diferentes ácidos fenólicos como o caféico e clorogênico nas partes aéreas desta planta, tem despertado o interesse pelo estudo das suas propriedades antioxidantes. Estudos epidemiológicos mostraram que plantas ricas em flavonoides podem induzir efeitos benéficos para a saúde, que vão além de sua capacidade antioxidante (BLASINA et al., 2009).

A atividade antioxidante da marcela já foi demonstrada por diversos autores. Lima et al., (2017) verificaram que o uso de extrato de marcela a 0,5 e 0,75% em salsichas elaboradas com carne mecanicamente separada de tilápia, ocasionou a diminuição significativa do crescimento microbiológico e da oxidação lipídica. Ao avaliar a estabilidade lipídica com a utilização de extrato de marcela aplicado em embutido emulsionado com substituição da gordura por isolado proteico de resíduo de pescado, Palezi (2011) verificou que o extrato hidro-etanólico de marcela foi eficiente na inibição da oxidação lipídica. Da mesma forma, Piovesan et al., (2017), corroboram que o uso de extrato hidro-etanólico de marcela a 0,75% em linguiça de frango reduziu a produção de substâncias reativas ao acido tiobarbitúrico. O

uso de extrato hidro-etanólico de marcela a 1% em salame controlou a oxidação lipídica, mantendo o produto com baixos valores de TBARS (CAMPAGNOL et al., 2011).

Figura 3: Marcela (*Achyrocline satureioides*)

Fonte: Google Imagens

3.5 CAPIM-LIMÃO

O capim-limão (*Cymbopogon citratus*), também conhecido por erva cidreira, capim-cidreira ou lemongrass (Figura 4), é uma planta quase acaule, com folhas longas, estreitas e aromáticas, pertencente à família *Poaceae* (Gramineae). Esta planta é originária da Ásia e é muito cultivada em países tropicais. No Brasil, seus chás e extratos são utilizados na medicina popular como digestivos, antitussígenos, antigripais, analgésicos, antitérmicos, anti-inflamatórios das vias urinárias, diuréticos, antiespasmódicos, antialérgicos, entre outros (NEGRELLE; GOMES, 2007). Além disso, o capim-limão também é utilizado na aromatização de alimentos e na indústria de perfumes e cosméticos (GANJEWALA; LUTHRA, 2010).

Em diversos sistemas, extratos de capim-limão ou seus compostos específicos (ex. citral, β-mirceno e geraniol) têm apresentado atividade antimutagênica, antioxidante e anticarcinogênica (RABBANI; DEVI; KHANAM; ZAHRA, 2006).

A atividade antioxidante e antimicrobiana do capim-limão já foi demonstrada por alguns autores. Olorunsanya et al. (2009) verificaram que a adição de 1,5% da erva de capim-limão em empanados crus e cozidos de porco, foi efetiva para a redução da oxidação lipídica. O uso de extrato hidro-etanólico de capim-limão em bifes bovinos foi um dos mais eficazes como bactericida (TAYEL et al., 2012). Ao avaliar a estabilidade lipídica com a utilização de

extrato aquoso de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) aplicado em carne de frango picada irradiada Kanattn et al. (2014) verificaram que o uso do extrato aquoso de capim-limão foi eficiente para minimizar a oxidação lipídica. Da mesma forma, Siewe et al. (2015) verificaram que a incorporação de óleo essencial de capim-limão nas proporções de 1,0% e 2,0%, reduziram a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em empanados bovinos, em complemento a isso houve uma redução no crescimento das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Figura 4: Capim-limão (*Cymbopogon citratus*)

Fonte: Google Imagens

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 Artigo 1

Artigo em processo de avaliação na revista Ciência Rural

Extração assistida por ultrassom para obtenção de compostos bioativos, antioxidantes e antimicrobianos de marcela

Ultrasonic assisted extraction to obtain bioactive, antioxidant and antimicrobial compounds from marcela

Caroline Pagnossim Boeira[1*] Natiéli Piovesan[2] Marcela Bromberger Soquetta[3] Deborah Cristina Barcelos Flores[1] Bruna Nichelle Lucas[1] Juliano Smanioto Barin[1] Claudia Severo da Rosa[1] Nelcindo Nascimento Terra[1]

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das condições de extração sobre os compostos bioativos, bem como sobre a atividade antioxidante e atividade antimicrobiana do extrato com maior poder antioxidante. Os extratos foram obtidos pelo método convencional e extração assistida por ultrassom, variando a temperatura (20 ^{o} C, 40 ^{o} C e 60 ^{o} C). Foram quantificados os fenólicos totais, flavonoides totais, a atividade antimicrobiana, e atividade antioxidante pelos métodos DPPH, FRAP, e ORAC. Os métodos de extração convencional e ultrassom influenciaram no teor de fenólicos em todas as temperaturas avaliadas. Os flavonoides não sofreram influência dos métodos de extração. A atividade antioxidante máxima (DPPH) foi superior no método ultrassom em todas as temperaturas, entretanto pelo método FRAP os melhores resultados foram na extração convencional. Os métodos convencional e ultrassom não influenciaram no IC_{50} nas temperaturas de 20 ^{o}C e 40°C, mas a

[1]* Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: carolinepagnossim@hotmail.com. *Autor correspondente.
[2] Instituto Federal do Rio Grande do Norte, RN, Brasil.
[3] Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) Santa Maria, RS, Brasil.

atividade antioxidante pelo método ORAC sofreu influencia dos métodos em todas as temperaturas. O extrato obtido a 60 °C pelo método ultrassom possui elevada ação antimicrobiana frente a cepas de ***Salmonella sp***., ***Escherichia coli*** e ***Staphylococcus aureus***. De um modo geral, a extração assistida por ultrassom pode ser considerada adequada para obtenção de extratos de marcela, que são ricos em compostos bioativos com alta atividade antioxidante.

Palavras-chave: ultrassom, compostos bioativos, antioxidantes naturais, ***Achyrocline satureioides***.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of extraction conditions on bioactive compounds, as well as on antioxidant activity, and the antimicrobial activity of the extracts with the highest antioxidant characteristics. The extracts were obtained by conventional method and ultrasound-assisted extraction at various temperatures (20 °C, 40 °C and 60 °C). Total phenolics, total flavonoids, antimicrobial activity and antioxidant activity were quantified by the methods of DPPH, IC_{50}, FRAP, and ORAC, respectively. The conventional extraction method and the ultrasound method influenced the phenolic content at all the tested temperatures. Flavonoids were not influenced by extraction methods. The maximum antioxidant activity (DPPH) was highest in the ultrasonic method at all the temperatures; however, in the case of the FRAP method the best results were for the conventional extraction method. The conventional and ultrasonic methods did not influence the IC_{50} at temperatures of 20 °C and 40 °C, but using ORAC the antioxidant activity was influenced by the methods at all temperatures. The extract obtained at 60 °C by the ultrasound method had high antimicrobial action in relation to the strains of ***Salmonella sp***., ***Escherichia coli***, and ***Staphylococcus aureus***. In general, ultrasonic-assisted extraction can be considered adequate

to obtain extracts of marcela, which are rich in bioactive compounds with high antioxidant activity.

Key words: ultrasound, bioactive compounds, natural antioxidant, ***Achyrocline satureioides***

INTRODUÇÃO

A marcela (***Achyrocline satureioides***) é uma planta medicinal com alto conteúdo de compostos polifenólicos, na maioria flavonóides, e de diferentes ácidos fenólicos como o caféico e clorogênico. É uma erva usada no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai por suas propriedades analgésicas, antimicrobiana, antiespasmódica, anti-inflamatória, antitumoral e elevado potencial antioxidante (BLASINA et al., 2009).

Segundo ZHENG & WANG (2001) tem-se aumentado consideravelmente o interesse em encontrar antioxidantes de ocorrência natural para uso em alimentos, visando substituir os sintéticos. Neste sentido, encontrar métodos extrativos eficientes bem como a caracterização de compostos bioativos a partir de fontes naturais é um grande desafio para os pesquisadores.

Os métodos de extração, a parte do material vegetal utilizada, a origem deste, o grau de processamento, o tamanho da partícula, o solvente utilizado, o tempo de extração, temperatura, polaridade e concentração do solvente influenciam sobre os extratos obtidos (TIWARI et al., 2011).

A extração com o uso de ultrassom apresenta-se como uma técnica extrativa promissora por promover a extração exaustiva de princípios ativos de vegetais com gasto de energia relativamente pequeno, economia de tempo e maior segurança no processo. Segundo ROCHA et al. (2009) as ondas geradas no processo propagam-se no meio líquido, originando variações de pressão, responsáveis pela criação e implosão de microbolhas de gás no centro de um líquido. Essa alta frequência forma ondas de choque no momento da implosão das

bolhas e também produz um efeito vibratório na célula vegetal, capaz de levá-la a ruptura e, com isso, a liberação do seu conteúdo.

Baseando no exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das condições de extração sobre os compostos bioativos, atividade antioxidante e determinar a atividade antimicrobiana do melhor extrato de marcela (***Achyrocline satureioides***).

MATERIAIS E MÉTODOS

As inflorescências de marcela foram colhidas no mês de abril na zona rural de Santa Maria (RS). A espécie ***Achyrocline satureioides*** está sob o número de registro 388117. A marcela foi seca em estufa a 45 ° C (±5) por 48 horas, triturada em moinho de facas tipo Willy e passada em peneira de 20 mesh. O material foi armazenado em freezer doméstico em sacos de polietileno à temperatura de -18 °C até o término das análises.

Os extratos hidroalcoólicos foram preparados a partir de 5g de marcela triturada adicionado de 50 mL de álcool de cereais 70%, proporção 1:10 (p/v). Para extração pelo método convencional, esta mistura foi mantida em banho ultratermostatizado (Marconi, modelo MA- 184, São Paulo, Brasil) e submetida agitação constante utilizando agitador (Marconi MA-039, São Paulo, Brasil), durante 20 minutos em diferentes temperaturas 20 º C, 40 º C, 60 ° C. Para o método de extração por ultrassom o álcool de cereais e a marcela foram imersos em banho ultrassom (QUIMIS®, modelo Q335D, São Paulo, Brasil) operando em frequência de 40 kHz durante 20 minutos em diferentes temperaturas 20 º C, 40 º C, 60 ° C. Em seguida os extratos foram centrifugados a 202 G por 10 minutos e filtrados, sendo o volume ajustado com solvente para 50 mL, após foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em freezer (-18 °C) até o momento das análises.

A determinação de compostos fenólicos totais foi feita pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por ROESLER (2007), que sugere incubar os tubos durante 5 minutos em banho-

maria a 50°C. Para a quantificação foi realizada uma curva de calibração (y = 0,0012x + 0,021 R^2 = 0,9953) utilizando ácido gálico em concentrações de 10 a 500 $mg.L^{-1}$. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico/ g de marcela (mg EAG g^{-1}).

O teor de flavonóides totais foi determinado pelo método proposto por ZHISHEN, MENGCHENG & JANMING (1999). Para o cálculo foi realizada curva de calibração (y = 0,0027x - 0,0772 R^2 = 0,9672) utilizando quercetina em concentrações de 25 a 200 $mg.L^{-1}$ .O teor de flavonóides totais foi expresso em mg equivalente de quercetina/ g de marcela (mg EQ g^{-1}).

A atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) foi determinada conforme metodologia descrita por BENZIE & STRAIN (1996). O composto TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) (faixa de 2,5 a 25µM) foi utilizado para a curva de calibração (y= 0,0601x - 0,0679 R^2 = 0,9937). Os resultados expressos em µmol equivalentes de trolox / g de marcela (µmol TEAC g^{-1}).

A determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) foi feita segundo BRAND-WILLIAMS, CUVELIER & BERSET (1995). Incubou-se 2,5 mL de uma solução metanólica de DPPH 0,1 mM com 0,5 mL de soluções contendo concentrações crescentes dos extratos, por 30 minutos e ausência da luz. Os resultados foram expressos como percentual (%) de inibição de oxidação do radical DPPH, de acordo com a fórmula 1:

$$\%DPHH_{Inibiçãodoradical} = [(A_0 - A_s) \div A_0] \times 100 \qquad (1)$$

Onde A_0 é absorbância controle, A_s é a absorbância da amostra. Para o cálculo do IC50, utilizou-se a equação da reta obtida dos valores da absorbância (AA%) das concentrações crescentes das amostras, substituindo o valor de Y por 50, obtendo-se o valor de X como a concentração da amostra com capacidade para reduzir 50% do DPPH.

A capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) foi analisada conforme proposto por DÁVALOS, GÓMEZ-CORDOVÉS & BARTOLOMÉ (2004). A intensidade da fluorescência (excitação a 485 nm e emissão a 525 nm) foi monitorada a cada minuto, durante 120 minutos, no leitor de microplacas Sinergy Mx (BioTeK, Winooski, EUA). A curva padrão foi preparada com solução de Trolox (0 a 96 mM), e os resultados foram expressos em µmol equivalente de Trolox por grama de marcela (µmol Trolox/g).

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada conforme técnica descrita por SOQUETTA (2016), com modificações, nesta técnica foi utilizado o extrato obtido na extração por ultrassom a 60 ^{o}C, no método de difusão em disco, empregando três cepas bacterianas (***Salmonella Enteritidis*** ATCC 13076, ***Escherichia coli*** ATCC 25922, e ***Staphylococcus aureus*** ATCC25923). As culturas, obtidas a partir de suspensões em caldo BHI e densidades ajustadas à turvação do tubo com 0,5 da escala de McFarland (10^{8}UFC/mL), foram semeadas na superfície de placas contendo o meio Agar Muller-Hinton. Sobre o meio foram colocados discos de papel filtro (6 mm de diâmetro) embebidos com 20 µl de extrato, para controle positivo foi utilizado disco com 30 µg de cloranfenicol e para controle negativo os discos de papel foram embebidos em água destilada esterilizada. As placas foram incubadas em estufa (37 ° C) por 24 horas.

Os extratos e as análises foram conduzidos em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si através do teste de Tukey, a 5% de significância, através do programa computacional Statistica®7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos obtidos pelo método convencional nas temperaturas de 20 °C e 60 °C apresentaram maiores teores de fenólicos comparados a temperatura de 40 °C, para

flavonóides o aumento da temperatura não influenciou. Em contra partida MIGLIATO (2011) investigaram a influência da temperatura na extração de flavonóides de folhas de ***Syzygium cumini*** (L.) ***Skeels***, e observaram que o aumento da temperatura afetou de forma significativa a extração de flavonóides. Para o método de ultrassom o extrato obtido a 60 °C mostrou maior teor de fenólicos, mesma forma para flavonóides o aumento da temperatura influenciou positivamente. Em outro estudo, AZEVEDO (2010) verificou que as condições ótimas de operação para a obtenção desses compostos estão na faixa de temperatura entre 50 °C a 60 °C. TABARAKI et al. (2012) corroboram ao relatarem que a temperatura influencia o processo de extração, uma vez que o calor torna a parede celular mais permeável, aumentando a solubilidade dos compostos e o coeficiente de difusão do solvente.

Comparando os dois métodos de extração pode-se observar que em todas as temperaturas os extratos obtidos tiveram diferença significativa quanto ao teor de fenólicos e que os maiores resultados foram obtidos na extração por ultrassom. Esse resultado entra em conformidade com o estudo de GUSS et al. (2017) que ao comparar os métodos de extração de compostos bioativos de marcela, verificou que o ultrassom obteve os maiores resultados para conteúdo de fenólicos totais.

Diferentes técnicas são usadas para determinar a atividade antioxidante in vitro a fim de permitir a seleção de substâncias e matrizes puras com esta propriedade. No presente estudo, as atividades antioxidantes dos extratos de marcela foram avaliadas pelos seguintes métodos: FRAP, DPPH e ORAC. A tabela 1 mostra que na extração pelo método ultrassom à temperatura de 60 ^{o}C o IC_{50} do extrato foi menor, consequentemente a elevação da temperatura aumentou a atividade antioxidante. A atividade antioxidante pelo FRAP no método convencional não variou nas temperaturas de 20 °C e 40 °C, porém houve aumento da atividade na temperatura de 60 °C contudo pelo método de ORAC a temperatura que favoreceu a extração foi de 20 °C, analisando o método de ultrassom nas diferentes

temperaturas, pode-se perceber que o método não influenciou o IC_{50} nas temperaturas de 20°C e 40 °C, já a temperatura de 60 °C apresentou o menor valor, consequentemente maior atividade antioxidante. No método de FRAP o aumento de temperatura não influenciou na atividade antioxidante, o método de extração pelo ultrassom influenciou positivamente a atividade antioxidante pelo ORAC na temperatura de 40 °C e 60 °C diferenciando-se estatisticamente da temperatura de 20 °C.

Comparando os dois métodos de extração quanto ao IC_{50} observa-se que o método ultrassom diferiu significativamente na temperatura de 60 °C do método de convencional apresentando maior atividade antioxidante, entretanto nas demais temperaturas os métodos não diferiram-se. Analisando a atividade antioxidante pelo método de FRAP o método de extração convencional foi melhor que o ultrassom em todas as temperaturas testadas, assim como para o IC_{50}, onde apenas na temperatura de 60 °C houve diferença estatística. Segundo GUIMARÃES et al. (2011) pode haver variação da atividade antioxidante, dependendo do composto e da concentração deste para cada metodologia separadamente, neste caso o método ultrassom provavelmente tenha extraído mais compostos que facilitem a doação de um hidrogênio por parte destes compostos para neutralizar o radical DPPH. A determinação pelo método de FRAP depende do potencial redox dos compostos extraídos no extrato, que são caracterizados pela complexidade de suas moléculas, provavelmente os compostos extraídos com solução hidroalcoólica tenham potencial redox para serem quantificados por este método (PULIDO et al, 2000). O método de ORAC mostra que nas temperaturas de 40 ^{o}C e 60 ^{o}C o método ultrassom foi melhor, apresentando maior atividade antioxidante.

A atividade antioxidante máxima pelo DPPH (Figura 1) no método ultrassom foi maior para todas as temperaturas testadas, quando comparado com o método convencional, coincidindo com o menor IC_{50} na temperatura de 60 °C. No método convencional não houve diferença significativa entre as temperaturas testadas.

Pode-se perceber também que os extratos obtidos pelo método convencional apresentaram atividade antioxidante máxima entre 80% e 90% e os obtidos pelo método de ultrassom apresentaram valores acima de 90%. Segundo MELO et al. (2008) a capacidade antioxidante pode ser considerada forte, quando o percentual de sequestro do radical DPPH apresentar valores acima de 70%, e moderado quando atingir valores entre 50% e 70%. Com isso, todos os extratos de marcela obtidos possuem atividade antioxidante forte.

O extrato de marcela apresentou inibição frente a todas às cepas avaliadas, ***Salmonella sp.*** (10,25±0,24), ***Staphylococcus aureus*** (21,70±0,20) *e* ***Escherichia coli*** (13,40±0,15). Segundo MOTHANA & LINDEQUIST (2005), halos de inibição de 8 a 13 mm de tamanho são considerados extratos com poder de ação moderadamente ativos, já halos de inibição >14 mm de tamanho são extratos muito ativos, considerando que o tamanho dos halos da marcela ficaram entre 10 e 21 mm, o extrato de marcela é muito ativo frente às cepas de ***Staphylococcus aureus*** e ***Escherichia coli***, e moderadamente ativo frente a ***Salmonella sp.***. Segundo Souza et al. (2002) os resultados deste estudo sugerem que os componentes químicos desta planta sejam os responsáveis por tal ação frente às bactérias analisada, sendo estes flavonóides, quercetina, 3-O-metilquercetina e luteolina.

CONCLUSÃO

A extração assistida por ultrassom foi melhor que o método convencional para os extratos de marcela, que são ricos em compostos bioativos com alta atividade antioxidante. Os resultados demonstram ainda que a temperatura de 60 °C apresentou maior rendimento de extração. A marcela apresenta ação antimicrobiana frente a cepas de ***Salmonella sp.***, ***Escherichia coli*** e ***Staphylococcus aureus***. Desse modo, devido seu baixo custo de obtenção e sua grande disponibilidade, a marcela pode ser considerada uma promissora fonte natural de

obtenção de extratos ricos em compostos antioxidantes, destinados a substituir os antioxidantes sintéticos na indústria alimentícia.

DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE

Não há conflitos de interesse a declarar.

REFRÊNCIAS

AZEVEDO, J.C.S. Estratégias de obtenção do corante do jambo vermelho (***Syzygium malaccense***) e avaliação de sua funcionalidade. 2010. 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the frap assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, p.70-76, 1996. Available from: < https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292> Accessed: Jun. 20, 2017. doi: 10.1006/abio.1996.0292.

BLASINA, M.F. et al. Differentiation induced by ***Achyrocline satureioides*** (Lam) infusion in Pc 12 cells. **Phytother Research**. v.23, n.9, p. 1263-1269, 2009. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2607> Accessed: Jun. 05, 2017. doi: 10.1002/ptr.2607.

BRAND-WILLIANS, W. et al. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology,** v. 28, p. 25-30, 1995. Available from: <https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5> Accessed: Jun. 20, 2017. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

DÁVALOS, A. et al. Extending applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC- Fluorescein) Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52 p. 48-54,

2004. Available from: < http://dx.doi.org /10.1021/jf0305231> Accessed: Jun. 10, 2017. doi: 10.1021/jf0305231.

GUIMARÃES, L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n.2, p. 464-472, 2011. Available from: < http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902011000200028 > Accessed: Jun. 09, 2017. doi: 10.1590/S1806-66902011000200028.

GUSS, K.L et al. Ultrasound-assisted extraction of ***Achyrocline satureioides*** prevents contrastinduced nephropathy in mice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.37, p. 368-374, 2017. Available from: < https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.035> Accessed: Jun. 22, 2017. doi: 10.1016/j.ultsonch.2017.01.035.

MELO, A.E. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 193-201, 2008. Available from: < http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322008000200005 > Accessed: Jun. 09, 2017. doi: 10.1590/S1516-93322008000200005 .

MIGLIATO, K.F. et al. Factorial design of the optimization extraction of ***Syzygium cumini (L.) Skeels*** fruits. **Química Nova**, v.34, n.4, p.695-699, 2011. Available from: < http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000400024.> Accessed: Jun. 10, 2017. doi: 10.1590/S0100-40422011000400024.

MOTHANA, R.A.A.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. **Journal of Ethnopharmacology Etnopharmacology**, v. 96, p. 177-181, 2005. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.006> Accessed: Jul. 27, 2017. doi: 10.1016/j.jep.2004.09.006.

PULIDO, R. et al. Antioxidant activity of dietary polyphenolics as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**,

v.48, n.8, p.396-3402, 2000. Available from: < https://doi.org/10.1021/jf9913458> Accessed: Jun. 09, 2017. doi: 10.1021/jf9913458

ROCHA, L. G. et al. Evaluation of the leishmanicide action of ethanol extracts of ***Crotalaria retusa L***. (Fabaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.19, p.51-56, 2009. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000100012 > Accessed: Jun. 23, 2017. doi: 10.1590/S0102-695X2009000100012

ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of cerrado fruits. **Science and Food Technology**, v.27, p.53-60, 2007. Available from: <10.1590/S0101-20612007000100010 > Accessed: Jun. 05, 2017. doi: 10.1590/S0101-20612007000100010.

SOQUETTA, M.B. et al. Characterization of physiochemical and microbiological properties, and bioactive compounds, of flour made from the skin and bagasse of kiwi fruit (***Actinidia deliciosa***). **Food Chemistry**, v.199, p.471–478, 2016. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.022 > Accessed: Jun. 29, 2017. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.12.022.

SOUZA, K.C.B. et al. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3- O -methylquercetin in ***Achyrocline satureioides*** preparations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.28, p.771–777, 2002. Available from: <https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00693-8> Accessed: Jun. 04, 2017. doi: 10.1016/S0731-7085(01)00693-8

TABARAKI, R. et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (***Punicagranatum* L.**) peel antioxidants by response surface methodology. **Separation and *Purification Technology***, v.98, p.16-23, 2012. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.06.038> Accessed: Jun. 29, 2017. doi: 10.1016/j.seppur.2012.06.038

TIWARI, P. et al. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Sciencia**, v.1, p.98-106, 2011.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.9, p.5165- 5170, 2001. Available from: < http://doi.org/10.1021/jf010697n> Accessed: Out. 08, 2017. doi: 10.1021/jf010697n

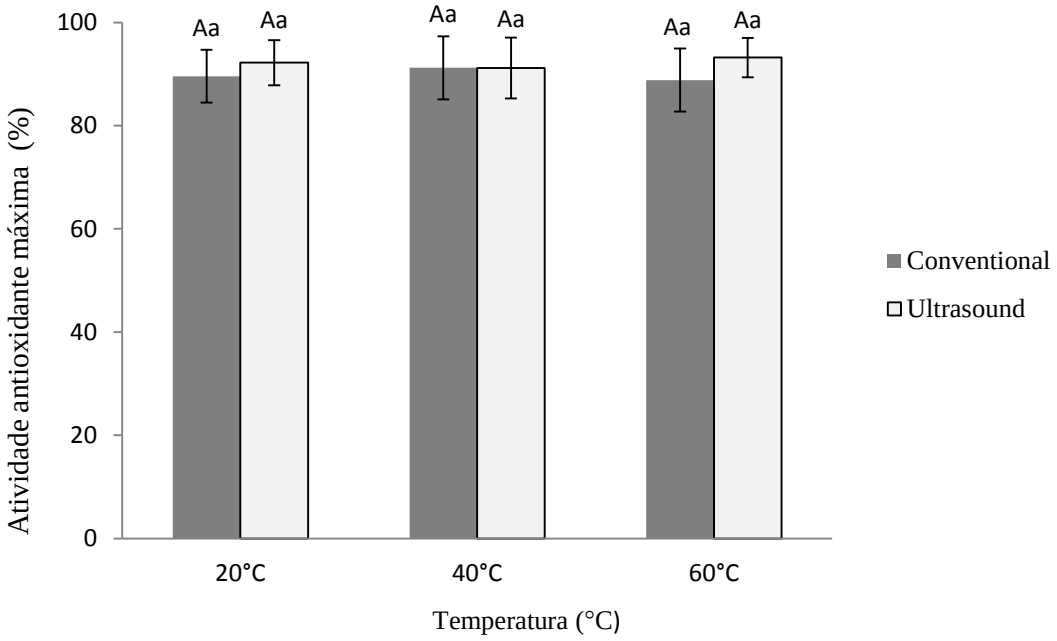
ZHISHEN, J. et al. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v.64, p.555-559, 1999. Available from: < http://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2> Accessed: Out. 12, 2017. doi: 10.1016/S0308-8146(98)00102-2

Tabela 1: Fenólicos totais, flavonóides totais, capacidade inibitória (IC_{50}), capacidade de redução de ferro (FRAP) e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) dos extratos obtidos por diferentes métodos e temperaturas de extração.

Temperatura (°C)	Método Convencional	Método Ultrassom
	Fenólicos Totais (mgGAE/g)	
20 °C	313.05^{Ba} ±1.63	299.28^{Cb} ±0.81
40 °C	246.15^{Ab} ±2.61	315.48^{Ba} ±2.45
60 °C	312.30^{Bb} ±2.37	346.62^{Aa} ±0.32
	Flavonóides Totais (mgQE/g)	
20 °C	21.53^{Aa} ±2.93	17.28^{Ca} ±0.48
40 °C	19.72^{Aa} ±0.82	19.90^{Ba} ±0.54
60 °C	20.35^{Aa} ±1.31	21.50^{Aa} ±0.39
	IC_{50} (mg/mL)	
20 °C	0.37^{Aa} ± 0.08	0.48^{Ba} ± 0.04
40 °C	0.42^{Aa} ± 0.05	0.46^{Ba} ± 0.03
60 °C	0.45^{Aa} ± 0.03	0.28^{Ab} ± 0.06
	FRAP (µmol TEAC/g)	
20 °C	13.11^{Ba} ± 1.81	9.46^{Ab} ± 1.46
40 °C	14.22^{Ba} ± 1.87	9.29^{Ab} ± 2.47
60 °C	18.85^{Aa} ± 2.94	11.40^{Ab} ± 0.38
	ORAC (µm Trolox/g)	
20 °C	1042.75^{Aa} ± 5.72	866.90^{Ab} ± 3.67
40 °C	882.65^{Cb} ± 1.62	1057.25^{Ba} ±4.73
60 °C	1005.17^{Bb} ±1.85	1060.10^{Ba} ±7.6

Resultados são expressos em Média ± DP (n=3).
GAE = Ácido galico equivalente;
QE: Quercetina equivalente;
TEAC = trolox equivalente antioxidante capacidade.
^{A,B}Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p>0,05) no mesmo método de extração entre diferentes temperaturas testadas. ^{a,b} Letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa entre as mesmas temperaturas para diferentes métodos de extração.

Figura 1: Percentual de atividade antioxidante máxima (%) dos extratos de marcela, obtidos por diferentes métodos e temperaturas de extração.



Resultados são expressos em Média ± DP (n=3).
[A,B]Letras maiúsculas iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p>0,05) no mesmo método de extração entre diferentes temperaturas testads. [a,b] Letras minúsculas iguais não apresentam diferença significativa entre as mesmas temperaturas para diferentes métodos de extração.

4.2 Artigo 2

Configuração conforme normas da Revista International Food Research Journal

Extração de compostos bioativos de capim-limão e avaliação da atividade antimicrobiana em linguiça frescal

[1*]Boeira, C.P., [2]Piovesan, N., [3]Soquetta, M.B., [1]Flores, D.C.B., [1]Lucas, B.N., [1]Barin, J.S., [1]Rosa, C.S., [1]Terra, N.N.

[1]Departamento de Ciência e Tecnologia em Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria RS, Brasil.

[2]Instituto Federal do Rio Grande do Norte, RN, Brasil.

[3]Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Maria RS, Brasil.

*Corresponding Author: carolinepagnossim@hotmail.com (Boeira, C.P)

Resumo: O objetivo deste trabalho foi determinar a melhor condição de extração de compostos bioativos do capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e avaliar a atividade antimicrobiana do extrato com maior poder antioxidante, em linguiças de frango refrigeradas durante o período de armazenamento. Os extratos foram obtidos pelo método convencional (extração com solvente) e por extração assistida por ultrassom, variando a temperatura (20 ^{o}C, 40 ^{o}C e 60 ^{o}C). Foram quantificados os compostos fenólicos, flavonoides totais, atividade antimicrobiana *in vitro*, e atividade antioxidante pelos métodos DPPH, FRAP, ORAC. Os resultados demonstram que a extração convencional foi melhor para obtenção de extratos de capim-limão, que são ricos em compostos bioativos com alta atividade antioxidante. A temperatura de 60 °C apresentou maior rendimento de extração. O capim-limão apresenta ação antimicrobiana *in vitro*, frente a cepas de *Salmonella sp., Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A avaliação da capacidade antimicrobiana na linguiça frescal, demonstrou que a concentração de 1,0% de extrato prolongou a vida de prateleira do produto em 21 dias quanto ao crescimento de aeróbios mesófilos e protegeu frente às bactérias psicotróficas durante todo o período de armazenamento.

Termos para indexação: *Cymbopogon citratus,* antioxidantes naturais, ultrassom

Introdução

O capim-limão (*Cymbopogon citratus*), pertencente à família das Poaceae, é uma planta aromática cultivada para produção comercial de óleo essencial, que geralmente apresenta como constituintes majoritários os monoterpenos citral (mistura isomérica de neral e geranial) e o mirceno (Prins *et al*., 2008). É uma planta perene que cresce principalmente em regiões tropicais e savanas (Negrelle & Gomes, 2007).

Vários estudos vêm sendo realizados na área de alimentos visando o desenvolvimento de extratos vegetais que exibam propriedades antimicrobianas e/ou

antioxidantes (Cerdeiras *et al*., 2001). As ervas e especiarias são uma das principais fontes de antioxidantes naturais na dieta humana (Hernández *et al*., 2009).

Os produtos cárneos podem se deteriorar rapidamente devido a processos oxidativos e o crescimento microbiano durante as etapas de processamento e armazenamento. Portanto, retardar e prevenir esses processos são fatores determinantes na qualidade final do produto (Krishnan *et al*., 2014).

Para garantir a segurança destes produtos, aumentar sua vida útil, controlar a oxidação lipídica e crescimento microbiano, a indústria recorre aos conservantes químicos (Moreira *et al*., 2005). Entretanto, as pesquisas têm relacionado esses conservantes a efeitos mutagênicos e carcinogênicos e por outro lado tem revelado compostos bioativos naturais com a mesma função, sem diminuição na qualidade dos produtos. Como resultado disso, há um grande interesse na obtenção e utilização de antioxidantes e antimicrobianos de fontes naturais (Mercadante *et al*., 2010).

A extração de compostos bioativos pode ser realizada de diferentes maneiras, normalmente utiliza-se a extração com uso de solventes orgânicos. No entanto, essa técnica é demorada, requer elevado tempo de extração e pode apresentar pouca eficiência, além disso, a presença de compostos termolábeis requer a utilização de técnicas a baixas temperaturas a fim de evitar a hidrólise, a solubilização e a degradação. A extração por ultrassom é também considerada uma tecnologia limpa na indústria de alimentos. O efeito que as ondas de ultrassom de alta potência têm sobre características físicas, bioquímicas e nas propriedades dos alimentos tem despertado um grande interesse devido à possibilidade do ultrassom produzir uma variedade de efeitos, dependendo da combinação de características entre as ondas de ultrassom e o produto, entre elas a melhor qualidade do extrato obtido (Vizzotto *et al*., 2011).

Muitas espécies vegetais possuem propriedades antimicrobiana e antioxidante, dentre estas espécies, destacam-se as plantas medicinais que, além de conferir características sensoriais próprias aos alimentos, podem desempenhar uma ação inibitória sobre o crescimento de microrganismos indesejáveis e reduzir os processos oxidativos o

que as torna úteis e uma alternativa mais saudável para as indústrias de alimentos, principalmente quando comparados aos conservantes químicos (Jayasena; Jo, 2014).

Muitos estudos *in vitro* relatam a eficácia dos extratos de plantas medicinais como antioxidantes e sua ação contra patógenos de origem alimentar e bactérias deteriorantes (Azerêdo *et al*., 2012; Andrade *et al*., 2012; Queiroz *et al*., 2016). No entanto, poucos estudos relatam a eficiência dos extratos aplicados diretamente nos alimentos como conservantes. Assim, são necessários estudos detalhados sobre a efetividade dos extratos quando empregados individualmente (Tajkarimi *et al*., 2010).

Baseando no exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar a melhor condição de extração de compostos bioativos de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e avaliar a atividade antimicrobiana do extrato com maior poder antioxidante, em linguiças de frango durante o período de armazenamento.

Materiais e Métodos

Matéria Prima

As folhas de capim-limão foram colhidas no mês de julho na zona rural de Santa Maria (RS). O capim-limão foi seco em estufa a 45°C (±5) por 48 horas, triturado em moinho de facas tipo Willy e passado em peneira de 20 mesh. O material foi armazenado em freezer doméstico em sacos de polietileno à temperatura de -18°C até o final das análises.

Obtenção dos extratos – extração convencional e extração por ultrassom

Os extratos hidroalcoólicos foram preparados a partir de 5g de capim-limão triturado adicionado de 50 mL de álcool de cereais 70%, proporção 1:10 (p/v). Para extração pelo método convencional, esta mistura foi mantida em banho ultratermostatizado (Marconi, modelo MA- 184, São Paulo, Brasil) e submetida agitação constante utilizando agitador (Marconi MA-039, São Paulo, Brasil), durante 20 minutos em diferentes temperaturas 20ºC, 40ºC, 60°C (Viera, 2016). Para o método de extração por ultrassom o álcool de cereais e o

capim-limão foram imersos em banho ultrassom (QUIMIS®, modelo Q335D, São Paulo, Brasil) operando em frequência de 40 kHz durante 20 minutos em diferentes temperaturas 20ºC, 40ºC, 60°C. Em seguida os extratos foram centrifugados a 202 G por 10 min e filtrados sendo o volume ajustado com solvente para 50mL, e acondicionados em frascos âmbar e armazenados em freezer (-18°C) até o momento das análises.

Determinação de Fenólicos Totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi feita pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Roesler (2007), que sugere incubar os tubos durante 5 minutos em banho-maria a 50°C. Para a quantificação foi realizada uma curva de calibração ($y = 0,0012x + 0,021$ $R^2 = 0,9953$) utilizando ácido gálico em concentrações de 10 a 500 $mg.L^{-1}$. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico/ g de capim-limão (mg EAG g^{-1}).

Determinação de Flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado pelo método proposto por Zhishen, Mengcheng & Janming (1999). Para o cálculo foi realizada curva de calibração ($y = 0,0027x - 0,0772$ $R^2 = 0,9672$) utilizando quercetina em concentrações de 25 a 200 $mg.L^{-1}$. O teor de flavonoides totais foi expresso em mg equivalente de quercetina/ g de capim-limão (mg EQ g^{-1}).

Poder antioxidante por meio da redução do Ferro (FRAP)

A atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) foi determinada conforme metodologia descrita por Benzie & Strain (1996). O composto TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) (faixa de 2,5 a 25μM) foi utilizado para a curva de calibração ($y= 0,0601x - 0,0679$ $R^2 = 0,9937$). Os resultados expressos em μmol equivalentes de trolox / g de capim-limão (μmol TEAC g^{-1}).

DPPH

A determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) foi feita segundo Brand-Williams, Cuvelier & Berset (1995). Incubou-se 2,5 mL de uma solução metanólica de DPPH 0,1 mM com 0,5 mL de soluções contendo concentrações crescentes dos extratos, por 30 minutos e ausência da luz. Os resultados foram expressos como percentual (%) de inibição de oxidação do radical DPPH, de acordo com a equação (1):

$$\%DPHH_{inibiçãodoradical} = [(A_0 - A_s) \div A_0] \times 100 \qquad (1)$$

Onde A_0 é absorbância controle, A_s é a absorbância da amostra. Para o cálculo do IC_{50}, utilizou-se a equação da reta obtida dos valores da absorbância (AA%) das concentrações crescentes das amostras, substituindo o valor de Y por 50, obtendo-se o valor de X como a concentração da amostra com capacidade para reduzir 50% do DPPH.

Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC)

A capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) foi analisada conforme proposto por Dávalos, Gómez-Cordovés e Bartolomé (2004). A intensidade da fluorescência (excitação a 485 nm e emissão a 525 nm) foi monitorada a cada minuto, durante 120 minutos, no leitor de microplacas Sinergy Mx (BioTeK, Winooski, EUA). A curva padrão foi preparada com solução de Trolox (0 a 96 mM), e os resultados foram expressos em µmol equivalente de Trolox por grama de capim-limão (µmol Trolox/g).

Determinação in vitro da capacidade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada conforme técnica descrita por Soquetta (2016), com modificações, nesta técnica foi utilizado o extrato obtido na extração convencional a 60 °C, no método de difusão em disco, empregando três cepas bacterianas (*Salmonella Enteritidis* ATCC 13076*, Escherichia coli* ATCC 25922*,* e *Staphylococcus aureus* ATCC25923). As culturas, obtidas a partir de suspensões em caldo *brain heart*

infusion (BHI) e densidades ajustadas à turvação do tubo com 0,5 da escala de *McFarland* (10^8UFC/mL), foram semeadas na superfície de placas contendo o meio Ágar *Muller-Hinton*. Sobre o meio foram colocados discos de papel filtro (6 mm de diâmetro) embebidos com 20 µl de extrato, para controle positivo foi utilizado disco com 30 µg de *cloranfenicol* e para controle negativo os discos de papel foram embebidos em água destilada esterilizada. As placas foram incubadas em estufa (37 ° C) por 24 horas.

Elaboração das linguiças de frango

A elaboração da linguiça de frango ocorreu na planta piloto de carnes e produtos cárneos do Centro de Ciências Rurais da UFSM e foram utilizadas as recomendações descritas por Terra (1998), seguindo as quantidades de ingredientes descritos pela Legislação (Brasil, 2000) conforme Tabela 1.

A elaboração das linguiças de frango iniciou-se com a separação da carne e pele (coxa e sobrecoxa de frango desossadas) com auxilio de facas esterilizadas. Após foi realizada a moagem da carne e pele de frango (Moedor Jamar PJ22, Jamar Ltda, São Paulo, Brasil) em disco com orifício de 12 mm, sendo levados a misturadeira (Jamar MJI 35, Jamar Ltda, São Paulo, Brasil) para a adição dos demais ingredientes até a formação da liga.

Para uma melhor comparação dos resultados, elaborou-se: uma formulação padrão (T1), adicionada de antioxidante sintético, o mesmo utilizado em linguiças comerciais (Eritorbato de sódio); uma formulação controle (T2), sem adição de antioxidantes; adição de 0,5% e 1,0% de extrato de capim-limão (T3 e T4), respectivamente (Tabela 1). A adição de alíquotas pré-definidas dos extratos hidro-alcoólicos foram adicionadas manualmente. Foram realizadas três repetições para cada tratamento (N= 12).

As massas cárneas foram embutidas em tripa suína natural previamente lavada para a remoção do sal e imersa em solução de acido láctico 1%, por 30 minutos para hidratação. Para armazenamento as linguiças de frango foram acondicionadas em bandejas de

poliestireno, embaladas com papel filme, identificadas e armazenadas em refrigerador a temperatura de 4°C.

Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas para verificar a estabilidade da linguiça. Seguiu-se, a cada sete dias, análises de mesófilos aeróbios totais e psicrotróficos totais, até completar quarenta e dois dias de armazenamento a 4°C.

Porções de 25g de linguiça de frango foram homogeneizadas com 225mL de água peptonada peptonada e as diluições (10^{-5}) em água peptonada 0,1% foram utilizadas para as análises microbiológicas. Foi realizada a contagem dos microrganismos mesófilos aeróbios totais, utilizando o meio de cultura ágar padrão em placas por profundidade (37°C/48h) e contagem de microrganismos psicrotróficos utilizando o meio de cultura Ágar Padrão com inoculação em placas em superfície (7°C/7 a 10 dias) (Brasil, 2003).

Análise estatística

Os extratos e as análises foram conduzidos em triplicata. O experimento foi repetido três vezes. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si através do teste de Tukey, a 5% de significância, através do programa computacional Statistica ®7.0.

Resultados e Discussão

Conteúdo de Fenólicos e Flavonóides Totais

O teor de fenólicos totais e flavonóides totais dos extratos de capim-limão estão apresentados na Tabela 2. O extrato obtido pelo método convencional na temperatura de 20 ^{o}C apresentou maior teor de fenólicos (141,42 mgGAE/g) comparado as demais temperaturas testadas neste método, para os teores de flavonoides o aumento da

temperatura não influenciou. Para o método de ultrassom o extrato obtido a 60 °C mostrou maior teor de fenólicos (135,81 mgGAE/G) e da mesma forma para flavonoides o aumento da temperatura influenciou positivamente. Em estudo realizado por Vedana *et al*. (2008) foi observado que a trituração associada a uma extração hidroalcoólica quente favoreceu a extração dos compostos fenólicos e consequentemente ao aumento da extração de compostos bioativos. Os trabalhos de Wang *et al*. (2008) e Ghafoor *et al*. (2009) corroboram com este estudo ao relatarem a maior extração de compostos fenólicos do farelo de trigo e sementes de uva com o aumento da temperatura de extração de 33 a 67 °C.

Tabaraki *et al*. (2012) também relataram que o aquecimento de extratos vegetais na temperatura entre 52 °C e 67 °C pode amolecer o tecido da parede celular e hidrolisar os compostos fenólicos ligados (fenol – proteína ou polissacarídeo – fenol), consequentemente aumentando sua solubilidade.

Comparando os dois métodos de extração pode-se observar que nas temperaturas de 40 e 60 ^{o}C os extratos obtidos não tiveram diferença significativa quanto ao teor de fenólicos, ou seja o método não influenciou nestas temperaturas. Comparando os métodos em relação aos flavonóides o extrato obtido pelo método convencional mostrou-se mais efetivo em todas as temperaturas.

Segundo Chemat *et al*. (2011) a extração assistida por ultrassom pode ser utilizada na extração de compostos termossensíveis utilizados em alimentos, devido a produção de bolhas em um líquido abaixo do seu ponto de ebulição, resultando em um forte estresse dinâmico, facilitando a dilatação e a hidratação do material, aumentando o tamanho dos poros da parede celular e otimizando os processos de difusão e de transferência de massa, contudo no método convencional a agitação constante durante a extração produziu maiores efeitos na matriz vegetal, bem como a circulação do solvente no sistema aumentando a transferência de massa (Corbin *et al*., 2015) .

Atividade antioxidante

O IC_{50} é um parâmetro usado para determinar o potencial antioxidante das plantas. Ele demonstra a quantidade de extrato da planta que é necessária para capturar em 50% o radical DPPH. Quanto maior o IC_{50}, maior será a quantidade necessária de substância para exercer a atividade antioxidante, dessa forma, um baixo IC_{50} significa que a planta tem um grande poder antioxidante (Negrelle & Gomes, 2007). A Tabela 3 mostra que na extração pelo método convencional à temperatura de 60 °C, o IC_{50} do extrato foi menor, consequentemente a elevação da temperatura aumentou a atividade antioxidante. Comparando os dois métodos de extração (Tabela 3), quanto ao IC_{50} observa-se que o método convencional diferiu significativamente na temperatura de 20 ^{o}C do método de ultrassom apresentando menor atividade antioxidante, entretanto nas demais temperaturas os métodos não diferiram-se. A atividade antioxidante pelo FRAP a extração convencional sofreu influencia da temperatura aumentando a atividade com o aumento da temperatura, contudo pelo método de ORAC a temperatura que favoreceu a extração foi de 40 °C, analisando o método de ultrassom nas diferentes temperaturas, pode-se perceber que o método não influenciou o IC_{50} nas temperaturas de 40 e 60 °C, apresentando valores inferiores, consequentemente maior atividade antioxidante. No método de FRAP o aumento de temperatura não influenciou na atividade antioxidante, o método de extração pelo ultrassom influenciou positivamente a atividade antioxidante pelo ORAC na temperatura de 60 °C diferenciando-se estatisticamente dos demais.

Analisando a atividade antioxidante pelo método de FRAP o método de extração convencional foi melhor que o ultrassom em todas as temperaturas avaliadas, assim como no método antioxidante de DPPH. Segundo Guimarães *et al*. (2011) pode haver variação da atividade antioxidante, dependendo do composto e da concentração deste para cada metodologia separadamente, neste caso o método convencional provavelmente tenha extraído mais compostos que facilitaram a doação de um hidrogênio por parte destes compostos para neutralizar o radical DPPH, uma vez que esta metodologia se baseia no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH de cor violeta quando

na presença de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio, neutralizando assim o radical (Brand-Williams *et al*., 1995). A determinação da atividade antioxidante pelo método de FRAP depende do potencial redox dos compostos extraídos no extrato, que são caracterizados pela complexidade de suas moléculas, provavelmente os compostos extraídos com solução hidroalcoólica tenham potencial redox para serem quantificados pelo método (Pulido *et al*., 2000). O método de ORAC mostra que nas temperaturas de 20 e 40 ^{o}C o método convencional foi melhor apresentando maior atividade antioxidante.

A atividade antioxidante máxima pelo DPPH no método convencional foi maior nas temperaturas de 20 e 60 ^{o}C, coincidindo com o menor IC_{50} na temperatura de 60 ^{o}C, já no método de ultrassom não houve diferença significativa entre as temperaturas avaliadas. Pode-se perceber também que os extratos obtidos pelo método convencional apresentaram atividade antioxidante entre 70 e 80% e os obtidos pelo método de ultrassom apresentaram entre 60 e 70%. Segundo Melo *et al*. (2008) a capacidade antioxidante pode ser considerada forte, quando o percentual de sequestro do radical DPPH apresentar valores acima de 70%, e moderado quando atingir valores entre 50 e 70%. Com isso, os extratos de capim-limão obtidos pelo método convencional possuem atividade antioxidante forte, enquanto que os obtidos pelo método ultrassom possuem atividade intermediária. Sacchetti *et al*. (2005) avaliando as atividades antioxidantes de vários óleos essenciais pelo método convencional encontraram mais de 60% de atividade antioxidante pelo método de DPPH para o óleo essencial de capim-limão.

Segundo Shirsath *et al*. (2012), um dos parâmetros que merecem atenção na extração por ultrassom é a frequência do aparelho, pois de acordo com o autor, frequências mais baixas, cerca de 20 kHz são mais eficazes em materiais de origem vegetal, como é o caso do capim-limão, devido aos efeitos promovidos pela cavitação durante a extração, pois as bolhas geradas no sistema podem implodir mais facilmente que as bolhas geradas em alta frequência, facilitando a liberação do composto (Esclapez *et al*., 2011). Nesta pesquisa,

a frequência do aparelho utilizado foi de 40 kHz, o que pode justificar o método convencional ter obtido melhor atividade antioxidante pelas metodologias de DPPH e FRAP.

Atividade antimicrobiana

O extrato de capim-limão apresentou inibição frente a todas às cepas avaliadas, *Salmonella sp.* (10,02±0,04), *Staphylococcus aureus* (10,60±0,27) *e Escherichia coli* (9,30±0,14). Segundo Mothana & Lindequist (2005), halos de inibição de 8 a 13 mm de tamanho são considerados extratos com poder de ação moderadamente ativos, já halos de inibição >14 mm de tamanho são extratos muito ativos, considerando que o tamanho dos halos do capim-limão ficaram entre 9 e 10 mm, o extrato pode ser considerado com ação moderada frente a essas cepas.

Estudos tem demonstrado e comprovado o efeito parasitológico do óleo essencial de capim-limão, contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Schuck *et al*., 2001). Tais resultados concordam com os obtidos neste experimento, visto que o maior halo inibitório foi obtido frente a *Staphylococcus aureus* (10,60 mm). Esta capacidade antimicrobiana do capim-limão é descrita na literatura por Lambert *et al*. (2001) pela presença do citral (composto formado pela mistura dos isômeros geranial e neral).

Análises microbiológicas da linguiça frescal

Segundo Terra (1998), contagem de até 10^6 UFC·g^{-1} é considerada faixa aceitável de contaminação microbiana em alimentos, o que também indica a qualidade sanitária dos alimentos. Desse modo para verificar a atividade antimicrobiana dos extratos de capim-limão durante o período armazenamento das linguiças de frango, foi realizada a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais e psicotróficos totais (Figura 1 e 2).

Nos resultados obtidos das contagens de microrganismos psicotróficos (Figura 1), que não são inibidos pelo efeito da refrigeração e consequentemente diminuem a vida-de-prateleira dos produtos frescais refrigerados, a adição do extrato de capim-limão na

concentração de 1,0% (T4) manteve o produto estável até o final do armazenamento quando comparado aos outros tratamentos, totalizando 42 dias.

Observa-se que para a contagem de aeróbios mesófilos, no período de 0 a 14 dias de armazenamento, em todos os tratamentos foram inferiores a 10^6 UFC·g^{-1} (Figura 2). Destaca-se ainda que os tratamentos com 0,5 e 1,0% de extrato de capim-limão permaneceram estáveis até o vigésimo primeiro dia de armazenamento, comprovando sua atividade antimicrobiana no produto cárneo.

Conclusão

A extração convencional foi melhor para obtenção de extratos de capim-limão, ricos em compostos bioativos com alta atividade antioxidante. Os resultados demonstram ainda que a temperatura de 60 °C apresentou maior atividade antioxidante.

O capim-limão apresenta ação antimicrobiana, *in vitro,* frente a cepas de *Salmonella sp., Escherichia coli,* e *Staphylococcus aureus*. A avaliação da capacidade antimicrobiana na linguiça frescal, demonstrou que a concentração de 1,0% de extrato manteve o produto estável até o vigésimo primeiro dia de armazenamento quanto ao crescimento de aeróbios mesófilos e protegeu o produto durante os 42 dias armazenados frente às bactérias psicotróficas.

Desse modo, devido seu baixo custo de obtenção e sua grande disponibilidade, o capim-limão pode ser considerado uma promissora fonte natural de obtenção de extratos ricos em compostos antioxidantes e antimicrobianos, destinados a substituir os antioxidantes sintéticos na indústria alimentícia.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos de mestrado ao primeiro autor e ao Departamento de Ciência e Tecnologia em Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

Referências

Andrade, M.A.; Cardoso, M.G.; Batista, L.R.; Mallet, A.C.T.; Machado, S.M.F. 2012. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. Revista Ciência Agronômica 43 (2): 399-408.

Azerêdo, G.A.; Stamford, T.L.; Figueiredo, R.C.; Souza, E.L. 2012. The cytotoxic effect of essential oils from *Origanum vulgare* L. and/or *Rosmarinus officinalis* L. on *Aeromonas hydrophila*. Food Borne Pathogens and Disease 9 (4): 298-304.

Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the frap assay. Analytical Biochemistry 239 (1): 70-76.

Brand-Willians, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology 28 (1): 25-30

Brasil. 2000. Instrução Normativa n.4, de 31 de março de 2000. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada, de mortadela, de linguiça e de salsicha. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p.6, 05 abr. Seção 1.

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

Cerdeiras, M.P.; Pianzzola, M. J.; Vázquez, A. 2001. The antibacterial activity of *Commelina erecta* extracts. International Journal of Antimicrobial Agents 17 (1): 423-424.

Chemat, F.; Zill, H.; Kamrankhan, M. 2011. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. Ultrasonics Sonochemistry 18 (4): 813-835.

Corbin, C.; Fidel, T.; Leclerc, E. A; Barakzoy, E.; Sagot, N.; Falguiéres, A.; Renouard, S.; Blondeau, J. P.; Ferroud, C.; Doussot, J.; Lainé, E.; Hano, C. 2015. Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum L.*) seeds. Ultrasonics Sonochemistry 26 (1): 176-185.

Dávalos, A.; Gómez-Córdovés, C.; Bartolomé, B. 2004. Extending applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC- Fluorescein) Assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 (1): 48-54.

Esclapez, M.D.; Perez, J.V.G.; Mulet, A.; Carcel, J.A. 2011. Ultrasound-assisted extraction of natural products. Food Engineering Reviews 3 (1): 108-120.

Franco, B.G.M.; Landgraf, M. 1999. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 182p.

Ghafoor, K.; Choi, H. C.; Jeon, J.Y.; Jo, I.H. 2009. Optmization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57 (11): 4988-4994.

Guimarães, L.; Graças, C. M.; Sousa, P. E.; Andrade, J.; Silveira, V. 2011. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. Revista Ciência Agronômica 42 (2): 464-472.

Hernández-Hernández, E.; Ponce-Alquicira, E.; Jaramillo-Flores, M.E.; Guerrero-Legarreta, I. 2009. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. Meat Science 81(2): 410-417.

Jayasena, D.D.; Jo, C. 2014. Potential application of essential oils as natural antioxidants in meat and meat products: a review. Food Reviews International 30 (1): 71-90.

Krishnan, K.R.; Babuskin, S.; Babu, P.A.; Fayidh, M.A.; Sabina K.; Archana, G.; Sivarajan, M.; Sukumar, M. 2014. Bio protection and preservation of raw beef meat using pungent aromatic plant substances. Journal of the Science of Food and agriculture 94 (12): 2456-2463.

Lambert, R.J.W.; Skandamis, P.N.; Coote, P.J. 2001. Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, timol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology 91 (3): 453- 462.

Melo, A.E.; Maciel, M.I.S.; De Lima, V.L.A. G.; Do Nascimento, R.J. 2008. Capacidade antioxidante de frutas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 44 (2): 193-201.

Mercadante, A.Z.; Capitani, C. D.; Decker, E. A.; Castro, I. A. 2010. Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. Meat Science 84 (4): 718-726.

Moreira, M. R.; Ponce, A.G.; Valle, E.; Roura, S.I. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. Food Science and Tecnhology 38 (5): 565-570.

Mothana, R.A.A.; Lindequist, U. 2005. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. Journal of Ethnopharmacology Etnopharmacology 96 (1): 177-181.

Negrelle, R.R.B.; Gomes, E.C. 2007. *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf: chemical composition and biological activities. Revista Brasileira de Plantas Medicinais 9 (1): 80-92.

Prins, C.L.; Freitas, S.P.; Campostrini, E.; Gravina, G.A.; Reis F.O. 2008. Efeitos de confinamento do sistema radicular sobre capim-limão (*Cymbopogon citratus*). Revista Ciência Agronômica 39 (3): 416-421.

Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenolics as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48 (8): 396-3402.

Queiroz, T.B.; Mendes, A.D.R; Silva, J.C.R.L.; Fonseca, F.S.A.; Martins, E.R. 2016. Teor e composição química do óleo essencial de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jaqc.) em função dos horários de coleta. Revista Brasileira de Plantas Medicinais 18 (1): 356-362.

Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C., Holanda, R. B., Sousa, C.A.S. and Pastore, G.M. 2007. Antioxidant activity of native fruits. Science and Food Technology 27 (1): 53-60.

Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chemistry 91 (1): 621-632.

Schuck, V.J.A.; Fratini, M.; Rauber, C.S.; Henriques, A.; Schapoval, E.E.S. 2001. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas 37 (1): 45-49.

Shirsath, S.R.; Sonawane, S.H.; Gogate, P.R. 2012. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - a review of current status. Chemical Engineering and Processing 53 (1): 10-23.

Soquetta, M.B.; Stefanello, F.S.; Huerta, K.M.; Monteiro, S.S.; Rosa, C.S.; Terra, N.N. 2016. Characterization of physiochemical and microbiological properties, and bioactive compounds, of flour made from the skin and bagasse of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). Food Chemistry 199 (1): 471-478.

Tabaraki, R.; Heidarizadi, E.; Benvidi, A. 2012. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punicagranatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. Separation and *Purification Technology* 98 (1): 16-23.

Tajkarimi, M. M.; Ibrahim, S.A.; Oliver, D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control 21 (9): 1199-1218.

Terra, N. N. 1998. Apontamentos de Tecnologia de Carnes. São Leopoldo: Editora Unisinos: 216p.

Vedana, M.I.S.; Ziemer, C.; Miguel, O.; Portella, A. C.; Candido, L.M.B. 2008. Efeito do processamento na atividade antioxidante de uva. Alimentos e Nutrição 19 (2): 159-165.

Viera, V.B. 2016. Compostos Bioativos, Atividade Antoxidante e Antimicrobiana na Casca de Cebola Roxa (*Allium cepa* l.) Submetidos a Diferentes Métodos de Extração**.** Rio Grande do Sul, Santa Maria, Brasil: Universidade Federal de Santa Maria. Mcs Tese.

Vizzotto, M.; Ereira, M.C. 2011. Amora-preta (*Rubus sp.*): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. Revista Brasileira de Fruticultura 33 (4): 1209-1214.

Wang, J.; Sun, B.; Cao, Y.; Tian, Y.; Li, X. 2008. Optimisation of ultrasoundassisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. Food Chemistry 106 (2): 804-810.

Zhishen, J., Mengcheng, T.; Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry 64 (1): 555-559.

Tabela 1: Ingredientes utilizados nas formulações das linguiças de frango.

Ingredientes (%)	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**
Retalhos de Frango	88	88	88	87,53
Pele de Frango	5,43	5,53	5,03	5,0
Água/gelo	3,0	3,0	3,0	3,0
Sal	2,34	2,34	2,34	2,34
Cura rápida	0,23	0,23	0,23	0,23
Alho moído	0,09	0,09	0,09	0,09
Pimenta preta moída	0,09	0,09	0,09	0,09
Glutamato	0,04	0,04	0,04	0,04
Fixador de cor	0,23	0,23	0,23	0,23
Condimento para linguiça de frango*	0,45	0,45	0,45	0,45
Eritorbato de sódio	0,1	-	-	-
Extrato de capim-limão	-	-	0,5	1,0
Total	100%			

T1- Adicionado de antioxidante sintético (Eritorbato de Sódio)
T2 - Sem adição de antioxidante
T3 - Com adição de 0,5% de extrato de capim-limão (CL)
T4 - Com adição de 1,0% de extrato de capim-limão (CL)
*Quantidade recomendada pelo fornecedor – Bremil Indústria de produtos alimentícios LTDA

Tabela 2: Teor de fenólicos totais e flavonóides totais dos extratos de capim-limão obtidos por diferentes métodos e temperaturas de extração.

	Método Convencional	**Método Ultrassom**
Temperatura (° C)	**Fenólicos Totais (mgGAE/g)**	
20 °C	141,42^{Aa} ±1,71	111,73^{Bb} ±2,94
40 °C	121,80^{Cb} ±3,92	114,22^{Bb} ±0,24
60 °C	133,84^{Ba} ±2,29	135,81^{Aa} ±4,58
	Flavonóides Totais (mgQE/g)	
20 °C	13,99^{Aa} ±1,52	10,33^{Ab} ±1,16
40 °C	13,53^{Aa} ±1,40	11,46^{Ab} ±0,64
60 °C	13,42^{Aa} ±0,27	12,09^{Ab} ±0,48

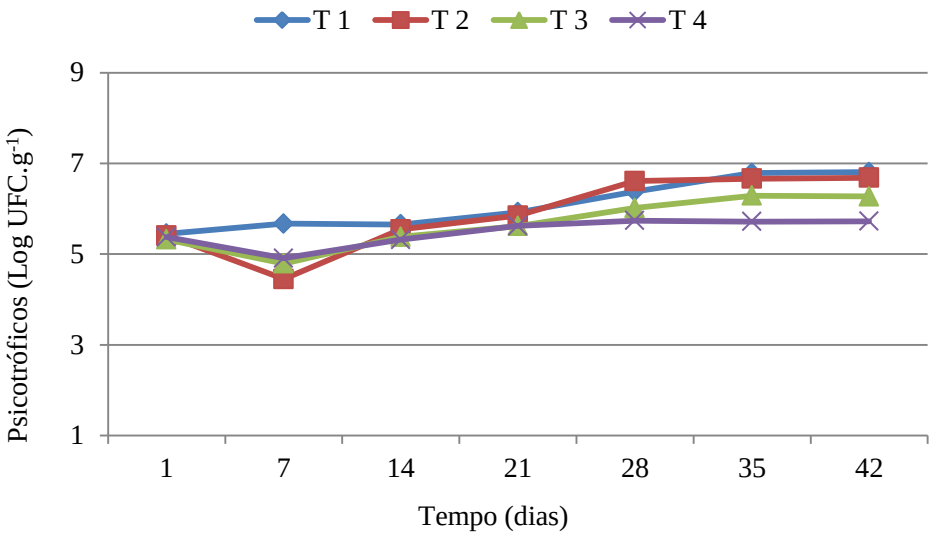
Resultados são expressos em Média ± DP (n=3).
GAE = Ácido galico equivalente; QE: Quercetina equivalente
^{A,B}Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p>0,05) no mesmo método de extração entre diferentes temperaturas testadas. ^{a,b} Letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa entre as mesmas temperaturas para diferentes métodos de extração.

Tabela 3: Capacidade inibitória (IC_{50}), capacidade de redução de ferro (FRAP), capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) e atividade antioxidante máxima (DDPH) dos extratos obtidos por diferentes métodos e temperaturas de extração.

Temperatura (° C)	Método Convencional	Método Ultrassom
	IC_{50} (mg/mL)	
20 °C	$0,89^{Ab}$ ±0,68	$1,46^{Aa}$ ±0,20
40 °C	$0,71^{Aa}$ ±0,11	$0,63^{Ba}$ ±0,08
60 °C	$0,45^{Ba}$ ±0,01	$0,52^{Ba}$ ±0,10
	FRAP (µmol TEAC/g)	
20 °C	$8,20^{Ba}$ ±0,64	$3,37^{Ab}$ ±0,84
40 °C	$8,10^{Ba}$ ±0,52	$5,40^{Ab}$ ±1,36
60 °C	$9,70^{Aa}$ ±0,69	$4,80^{Ab}$ ±0,83
	ORAC (µm Trolox/g)	
20 °C	$326,35^{Ca}$ ±4,31	$283,65^{Cb}$ ±3,32
40 °C	$364,00^{Aa}$ ±1,2	$355,60^{Bb}$ ±3,11
60 °C	$353,95^{Bb}$ ±5,4	$405,85^{Aa}$ ±4,5
	DPPH (%)	
20 °C	$86,76^{Aa}$ ±0,80	$67,69^{Ab}$ ±0,72
40 °C	$72,33^{Ba}$ ±1,12	$63,85^{Ab}$ ±0,89
60 °C	$87,39^{Aa}$ ±0,63	$68,71^{Ab}$ ±0,46

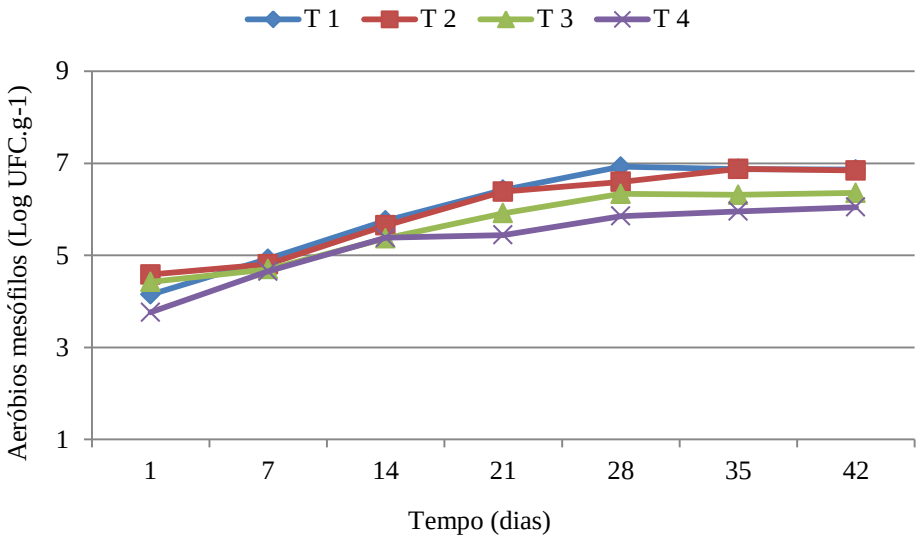
Resultados são expressos em Média ± DP (n=3).
TEAC = trolox equivalente antioxidante capacidade
^{A,B}Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p>0,05) no mesmo método de extração entre diferentes temperaturas testadas. ^{a,b} Letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa entre as mesmas temperaturas para diferentes métodos de extração.

Figura 1: Valores médios da contagem de microrganismos psicotróficos totais, das amostras de linguiça de frango, durante o período de armazenamento a 4 ºC (±1 ºC).



T1- Adicionado de antioxidante sintético (Eritorbato de Sódio)
T2 - Sem adição de antioxidante
T3 - Com adição de 0,5% de extrato de capim-limão (CL)
T4 - Com adição de 1,0% de extrato de capim-limão (CL)

Figura 2: Valores médios da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais das amostras de linguiça de frango, durante o período de armazenamento a 4 ºC (±1 ºC).



T1- Adicionado de antioxidante sintético (Eritorbato de Sódio)
T2 - Sem adição de antioxidante
T3 - Com adição de 0,5% de extrato de capim-limão (CL)
T4 - Com adição de 1,0% de extrato de capim-limão (CL)

4.3 Artigo 3

Configuração conforme normas da Revista Meat Science.

Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de linguiças de frango adicionadas de extratos de marcela (*Achyrocline satureioides*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) como antioxidantes

[1]Caroline Pagnossim Boeira*, [2] Natiéli Piovesan, [1]Déborah Cristina Barcelos Flores, [3]Marcela Bromberger Soquetta, [1]Bruna Nichelle Lucas, [1]Claudia Severo da Rosa, [1]Nelcindo Nascimento Terra

[1] Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
[2] Instituto Federal do Rio Grande do Norte, Pau dos Ferros, RN, Brasil.
[3] Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

*Autor Correspondente: Tel: 055-99966-2856
E-mail: carolinepagnossim@hotmail.com

Resumo

Os produtos cárneos, devido ao teor de umidade, proteínas, gorduras e outros nutrientes, tornam-se susceptíveis a alterações físico-químicas e microbiológicas, sendo que a forma mais comum de deterioração destes produtos é a oxidação lipídica. O presente estudo teve por objetivo aplicar diferentes concentrações de extrato de marcela (*Achyrocline satureioides*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) em linguiça de frango frescal como antioxidantes naturais, caracterizando as mesmas quanto a composição centesimal, pH, cor, oxidação lipídica, estabilidade microbiológica e atributos sensoriais. As linguiças de frango diferenciaram-se somente em relação à adição de antioxidante, os tratamentos foram: T1- padrão, com Eritorbato de sódio; T2- sem adição de antioxidante; T3 e T4 - adição de 0,5% e 1,0% de extrato de marcela, respectivamente; T5 e T6 - adição de 0,5% e 1,0% de extrato de capim-limão, respectivamente. Foram realizadas as análises de composição centesimal, a cada sete dias foram avaliados pH, atividade de água, cor, e índice de TBARS. A análise sensorial foi avaliada através do teste de aceitabilidade, teste de intenção de compra e o teste *check-all-which-apply* (CATA). Os resultados obtidos na composição centesimal mostraram que as linguiças estão de acordo com o Padrão de Identidade e Qualidade do Produto. As análises microbiológicas para *Staphylococcus* coagulase positiva, Coliformes a 45 º C, *Samonella sp* e *Clostridium sulfito redutor* dos produtos estão de acordo com a RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. O pH e atividade de água das linguiças de frango apresentaram um leve aumento ao final do tempo de armazenamento. O parâmetro b* mostra que os tratamentos T1 e T2 foram os que apresentaram maior oxidação lipídica em virtude da coloração amarelada, concordando com os dados de TBARS. Ao fim dos 42 dias de armazenamento, os valores de TBARS para o tratamento com adição de antioxidante sintético foi de 0,99 mg de malondialdeído (MDA) /kg enquanto que os tratamentos adicionados de extrato de marcela e capim-limão mantiveram-se abaixo de 0,4 mg de MDA/kg, sendo a linguiça adicionada de 1,0% de capim-limão a que apresentou menor oxidação lipídica ao longo dos 42 dias de armazenamento. As características sensoriais foram mantidas, demonstrando boa aceitabilidade pelos provadores. Os resultados do CATA mostraram que os tratamentos com 1,0 % de extrato de marcela e 0,5 e 1,0% de extrato de capim-limão foram os grupos que receberam os melhores atributos sensoriais, sendo os mais aceitos.

Palavras-chaves: linguiça de frango, antioxidantes naturais, oxidação lipídica.

Abstract

Meat products, due to moisture content, proteins, fats and other nutrients, become susceptible to physico-chemical and microbiological changes, and the most common form of deterioration of these products is lipid oxidation. The objective of the present study was to apply different concentrations of marcela extract (*Achyrocline satureioides*) and lemon grass (*Cymbopogon citratus*) in fresh chicken sausage as natural antioxidants, characterizing them as centesimal, pH, color, lipid oxidation, microbiological stability and sensory attributes. The chicken sausages differed only in relation to the antioxidant addition, the treatments were: T1- standard, with sodium erythorbate; T2-control, without antioxidant; T3 and T4 - addition of 0,5% and 1,0% of marcela extract, respectively; T5 and T6 - addition of 0,5% and 1,0% of lemon grass extract, respectively. The analyzes of centesimal composition were performed, every seven days were evaluated pH, water activity, color, and TBARS index. The sensory analysis was evaluated through the acceptability test, the intention to purchase test and the check-all-which-apply (CATA) test. The results obtained in the centesimal composition showed that the sausages are in accordance with the Standard of Identity and Product Quality. Microbiological analyzes for Staphylococcus coagulase positive, Coliformes at 45 °C, Samonella sp and Clostridium sulfite reductant of the products are in accordance with RDC n° 12 of January 2, 2001. The pH and water activity of the sausages of chicken presented a slight increase at the end of storage time. The parameter b* shows that T1 and T2 treatments presented the highest lipid oxidation due to the yellowish coloration, in agreement with TBARS data. At the end of the 42 days of storage, the TBARS values for the treatment with addition of synthetic antioxidant were 0,99 mg of MDA / kg while the added treatments of marcela extract and lemon grass remained below 0,4 mg of MDA / kg, and the sausage added was 1,0% of lemon grass, which presented lower lipid oxidation over the 42 days of storage. The sensorial characteristics were maintained, demonstrating good acceptability by the tasters. The results of CATA showed that the treatments with 1,0% of marcela extract and 0,5 and 1,0% of lemon grass extracts were the groups that received the best sensory attributes, being the most accepted.

Keywords: chicken sausage, natural antioxidants, lipid oxidation.

1 Introdução

Os produtos cárneos, devido ao teor de umidade, proteínas, gorduras e outros nutrientes, tornam-se susceptíveis a alterações físico-químicas e microbiológicas, sendo que a forma mais comum de deterioração destes produtos é a oxidação lipídica (Karakaya, Bayrak & Ulusoy, 2011).

A preocupação constante de proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade levou à adoção de medidas que permitem limitar a oxidação durante as fases de processamento e armazenamento dos produtos. O desenvolvimento dos processos oxidativos pode ser inibido por meio de diversas alternativas, entre elas o uso de substâncias antioxidantes (Rocha et al., 2003).

Os antioxidantes são substâncias que retardam ou inibem as alterações oxidativas nos alimentos através do sequestro de radicais livres. Podem ser naturais ou sintéticos, sendo que estes são os de maior utilização, devido à acessibilidade e maior estabilidade. Entretanto, as pesquisas têm relacionado possíveis efeitos mutagênicos e carcinogênicos e revelado compostos bioativos naturais com a mesma função, sem diminuição na qualidade dos produtos (Silva et al., 2010).

Como resultado disso, nos últimos anos, houve um aumento na procura de alternativas de fontes naturais, como os antioxidantes derivados das plantas, para combater a instabilidade oxidativa de lipídios e para aumentar a qualidade e a vida de prateleira de produtos cárneos. Desse modo, surge a necessidade de desenvolver novos estudos com aplicações de antioxidantes naturais em alimentos, avaliando os seus potenciais antioxidantes bem como seus efeitos na qualidade dos produtos (Falowo; Fayemi & Voster, 2014; Veeki et al., 2015).

A marcela e o capim-limão apresentam altos níveis de polifenóis, conhecidos por suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, apresentando-se dessa forma, como uma alternativa natural de compostos antioxidantes para serem aplicados em alimentos (Tavares et al., 2014; Salgueiro et al., 2016).

O presente estudo teve por objetivo aplicar diferentes concentrações de extrato de marcela (*Achyrocline satureioides*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) em linguiça de frango como antioxidantes naturais, caracterizando as mesmas quanto a composição centesimal pH, cor, oxidação lipídica, estabilidade microbiológica e atributos sensoriais.

2 Materiais e Métodos

2.1 Matéria Prima

A carne de frango e a tripa natural foram fornecidas por um frigorifico, sob inspeção federal, localizado na cidade de Santa Maria/RS. Os ingredientes e condimentos foram doados pela empresa Bremil Indústria de Produtos Alimentícios LTDA, localizada na cidade de Lajeado/RS.

2.2 Obtenção dos extratos de Marcela e Capim-limão

As inflorescências de marcela e as folhas de capim-limão foram colhidas nos meses de abril e julho de 2016, respectivamente, na zona rural de Santa Maria (RS). As ervas foram secas em estufa a 45°C (±5) por 48 horas, triturada em moinho de facas tipo Willey (Solab SL-31, São Paulo, Brasil) e passadas em peneira de 20 *mesh*. O material foi armazenado em freezer doméstico em sacos de polietileno à temperatura de -18°C até a elaboração dos extratos.

Os extratos de marcela e capim-limão foram preparados a partir de 5g de erva triturada adicionado de 50 mL de álcool de cereais 70%, proporção 1:10 (p/v). A partir de resultados prévios com diferentes metodologias de extração se verificou que o extrato de marcela contendo maior quantidade de compostos bioativos se deu com extração assistida por ultrassom e para o capim limão com o método convencional. Para extração dos compostos da marcela foi utilizada a metodologia de Cavalheiro (2013) com modificações, onde foi empregado o banho ultrassom (QUIMIS® Q335D, São Paulo, Brasil) operando em frequência de 40 kHz, na temperatura de 60°C durante 20 minutos (Viera, 2016). Para o capim-limão a extração foi realizada pelo método convencional em banho ultratermostatizado (Marconi MA- 184, São Paulo, Brasil), submetida agitação constante utilizando agitador (Marconi MA-039, São Paulo, Brasil), durante 20 minutos na temperatura de 60°C, segundo metodologia descrita por Reyes-Caudillo et al., (2008) com modificações. Em seguida os extratos foram centrifugados a 202 G por 10 min, filtrados e concentrado em rotaevaporador a vácuo (Fisatom 802, São Paulo, Brasil) utilizando temperatura de 45°C, para evaporação do álcool de cereais. Em seguida foi completado seu volume com água destilada, para manter a

concentração inicial, e acondicionados em frascos âmbar e armazenados em freezer (-18°C) até o momento da elaboração da linguiça de frango.

2.3 Elaboração das linguiças de frango

A elaboração da linguiça de frango ocorreu na planta piloto de carnes e produtos cárneos do Centro de Ciências Rurais da UFSM e foram utilizadas as recomendações descritas por Terra (1998), seguindo as quantidades de ingredientes descritos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000) conforme Tabela 1.

Tabela 1: Ingredientes utilizados nas formulações das linguiças de frango.

Ingredientes (%)	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Retalhos de Frango	88	88	88	87,53	88	87,53
Pele de Frango	5,43	5,53	5,03	5,0	5,03	5,0
Água/gelo	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Sal	2,34	2,34	2,34	2,34	2,34	2,34
Cura rápida	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
Alho moído	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
Pimenta preta moída	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
Glutamato	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Fixador de cor	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
Condimento para linguiça de frango*	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Eritorbato de sódio	0,1	-	-	-	-	-
Extrato de marcela	-	-	0,5	1,0	-	-
Extrato de capim-limão	-	-	-	-	0,5	1,0
Total	100%					

T1- Adicionado de antioxidante sintético (Eritorbato de Sódio); T2 – Sem adição de antioxidante; T3- Com adição de 0,5% de extrato de marcela (M); T4 – Com adição de 1,0% de extrato de marcela (M); T5 - Com adição de 0,5% de extrato de capim-limão (CL) e T6 - Com adição de 1,0% de extrato de capim-limão (CL). *Quantidade recomendada pelo fornecedor – Bremil Indústria de produtos alimentícios LTDA.

A elaboração das linguiças de frango iniciou-se com a separação da carne e pele (coxa e sobrecoxa de frango desossadas) com auxilio de facas esterilizadas. Após foi realizada a moagem da carne e pele de frango (Moedor Jamar PJ22, Jamar Ltda, São Paulo, Brasil) em disco com orifício de 12 mm, sendo levados a misturadeira (Jamar

MJI 35, Jamar Ltda, São Paulo, Brasil) para a adição dos demais ingredientes até a formação da liga.

Os tratamentos diferiram somente em relação ao antioxidante empregado. Para uma melhor comparação dos resultados, elaborou-se: uma formulação padrão (T1), adicionada de antioxidante sintético, o mesmo utilizado em linguiças comerciais (Eritorbato de sódio); uma formulação controle (T2), sem adição de antioxidantes; adição de 0,5% e 1,0% de marcela (T3 e T4), respectivamente; adição de 0,5% e 1,0% de capim-limão (T5 e T6), respectivamente (Tabela 1). A adição de alíquotas pré-definidas dos extratos hidro-alcoólicos foram adicionadas manualmente. Foram realizadas três repetições para cada tratamento (N= 18).

As massas cárneas foram embutidas em tripa suína natural previamente lavada para a remoção do sal e imersa em solução de ácido láctico 1%, por 30 minutos para hidratação. Para armazenamento as linguiças de frango foram acondicionadas em bandejas de poliestireno, embaladas com papel filme, identificadas e armazenadas em refrigerador a temperatura de 4°C.

2.4 Caracterização físico-química

A composição centesimal das linguiças foi realizada nos Laboratórios do Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos (UFSM). Todas as análises foram realizadas em triplicata e seguiram as metodologias descritas na *Association Of Official Analytical Chemists*, são elas*:* determinação de umidade (967.03), cinzas (942.05), proteína bruta (981.10) e extrato etéreo (920.39). Os carboidratos foram obtidos por diferença (AOAC, 1995).

2.5 Determinação de pH e atividade de água

As determinações de pH e atividade de água (Aa) foram realizadas em triplicata nos dias 1, 7, 14, 21, 28, 35 e 42. Para a determinação de pH, a linguiça foi misturada com água destilada na proporção 1:10 e mensurado através de um potenciômetro digital Digimed® (Modelo DM-23, São Paulo, Brasil), devidamente calibrado com soluções de pH 4,0 e pH 7,0 (AOAC, 2002). Para a análise de Aa utilizou-se 3g de linguiça, a temperatura ambiente (25°C), em equipamento específico, AquaLab® série 4TEV (Decagon Devicelnc., EUA).

2.6 Oxidação lipídica- TBARS

A avaliação da oxidação lipídica das linguiças foi realizada em triplicata pelo teste das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) segundo Raharjo et al. (1992), adaptado por Pereira (2009) com 10g de amostra previamente moída e homogeneizada em saqueta plástica, adicionado 40 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% e 1 mL do antioxidante sintético butilhidroxitolueno (BHT) 0,15%. A amostra foi homogeneizada por um minuto em *Stomacher* (Marconi MA- 440CF, São Paulo, Brasil) filtrada com auxílio de papel filtro qualitativo para balão volumétrico de 50 mL sendo o volume completado com a solução de ácido tricloroacético 5%. Deste balão, retirou-se uma alíquota de 2 mL e transferiu-se para tubo de ensaio, onde foi adicionado 2 mL de ácido tiobarbitúrico 0,08 M em acético 50%. Os tubos foram incubados em banho-maria fervente por 40 minutos. A leitura foi realizada em 531 nm e os resultados comparados contra o branco. Os valores de TBARS foram determinados nos dias 1, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 de armazenamento e os resultados foram expressos em mg de malonaldeído por quilograma de amostra (mg MDA/kg).

2.7 Determinação da cor

A cor das linguiças foi analisada nos dias 1, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 de armazenamento de acordo com o sistema da Comissão Internacional de Iluminação (CIE), usando os parâmetros L^*, a^* e b^* (escala CIELAB), através da leitura em colorímetro Minolta CR-400 (Minolta Sensing Inc. Konica, Japão) foi usado com modo de calibração à refletância espectral, com iluminante D65 e ângulo de observação de 10°. Foram efetuadas dez leituras na superfície de cada amostra de linguiça em diferentes pontos de três proporções. Os resultados foram expressos como L^*, a^* e b^*. O valor de L^* determina a posição do ponto sobre o eixo vertical de claridade; o valor de a* é do ponto sobre o eixo (-) verde/vermelho (+) e o valor de b^*, do ponto correspondente sobre o eixo (-) azul/amarelo (+).

2.8 Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas no primeiro dia de elaboração do produto. Foram realizadas as análises exigidas para linguiça frescal segundo a RDC

n°12, descrita pela ANVISA (Brasil, 2001), através metodologias dispostas na Instrução Normativa n° 62 da ANVISA (Brasil, 2003).

Porções de 25g de linguiça de frango foram homogeneizadas com 225mL de água peptonada e as diluições em água peptonada 0,1% foram utilizadas para as análises microbiológicas. Foram realizadas as contagens de coliformes a 45°C, em caldo EC (*Escherichia coli*), *Staphylococcus* coagulase positiva em Agar *Baird-Parker* (36°C/48h), *Salmonella sp.* em caldo tetrationato verde brilhante e *rappaports vassiliadis* (42,5°C/24h), seguidos de isolamento em placas contendo os meios SS e *Rajhans*, contagem *Clostridium* sulfito redutores em ágar SPS, incubadas em jarras de anaerobiose (Brasil, 2003).

2.9 Análise Sensorial

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 67063317.1.0000.5346) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS).

Um código de três dígitos foi atribuído às amostras, que foram avaliadas por cada consumidor em ordem monódica (Ares et al., 2010). Os testes foram realizados em cabines individuais com iluminação fluorescente. As linguiças de frango foram assadas e cortadas em 3 × 3 × 1 cm, embaladas individualmente em papel alumínio. Foram disponibilizados água mineral a temperatura ambiente e biscoito tipo água e sal para que o provador, entre as amostras, fizesse a limpeza das papilas gustativas. Cem consumidores habituais de linguiça de frango, não treinados, (65% do sexo feminino, 35% do sexo masculino, 17-55 anos) participaram dos testes sensoriais.

2.9.1. Teste de aceitação e intenção de compra

A aceitação das amostras foi verificada através do teste afetivo de aceitabilidade em nível laboratorial, apresentadas aos provadores de forma monódica e aleatória, através da utilização de uma escala hedônica estruturada de 9 pontos (9 - Gostei muitíssimo e 1 - Desgostei muitíssimo (Stone, Bleibaum, & Thomas, 2012). As amostras foram avaliadas com relação a cinco atributos: cor, odor, sabor, textura e aparência global (Meilgaard, Carr, & Civille, 2006). Em relação à intenção de compra das linguiças, foi utilizado o teste de atitude com avaliação através de escala de cinco

pontos (onde 5 corresponde a Decididamente eu compraria e 1 corresponde a Decididamente eu não compraria) (Dutcosky, 2011).

2.9.2. Avaliação do check-all-which-apply (CATA)

Os consumidores foram convidados a preencher um questionário *check-all-which-apply* (CATA) com 20 descritores relacionados às características sensoriais das linguiças. Os descritores utilizados no questionário CATA foram selecionados com base em estudos sobre descritores sensoriais para caracterização de novos produtos (Ares & Jaeger, 2013). A aparência dos atributos sensoriais cor (escura, estranha, clara, e uniforme), aroma (agradável e gorduroso), sabor (frango, oxidado, de ervas, tempero ideal, salgado, sem sal, apimentado) e textura (ideal, seca, úmida, consistente, macia, suculenta, de borracha) foram usados para caracterizar o perfil sensorial das linguiças.

2.10 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si através do teste de Tukey, a 5% de significância, através do programa computacional Statistica® 7.0. A análise da correspondência foi utilizada para analisar os dados do questionário da CATA, considerando a distância do qui-quadrado (Vidal, Tárrega, Antúnez, Ares, & Jaeger, 2015), calculado sobre a matriz contendo a frequência de uso de cada termo para cada amostra. O experimento foi repetido três vezes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição centesimal das linguiças de frango

Os valores encontrados para a composição centesimal, segundo a Tabela 2, mostram que os produtos estão de acordo com o Padrão de Identidade e Qualidade do produto (BRASIL, 2000), que estabelece o valor máximo de 70% para umidade, valor máximo de 30% para gordura e valor mínimo de 12% para proteína. A legislação para linguiça frescal não define padrão para as cinzas, entretanto os valores encontrados ficaram entre 3,68% a 3,83%.

Tabela 2: Composição centesimal das amostras de linguiça de frango refrigeradas.

Tratamentos	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteína (%)	Gordura (%)	Carboidratos (%)
T1	69,58 ± 0,82[a]	3,76 ± 0,01[ab]	16,69 ± 0,11[ab]	7,30 ± 0,71[a]	2,65 ± 1,29[a]
T2	70,55 ± 0,18[a]	3,72 ±0,01[ab]	16,30 ± 0,13[b]	6,91 ± 0,14[a]	2,49 ± 0,13[a]
T3	68,79 ± 0,34[a]	3,68 ± 0,02[b]	16,88 ± 0,13[a]	7,08 ± 0,33[a]	3,55 ± 0,38[a]
T4	69,17 ± 1,47[a]	3,79 ± 0,02[ab]	16,89 ± 0,10[a]	7,55 ± 0,10[a]	2,57 ± 1,44[a]
T5	69,84 ± 0,37[a]	3,76 ± 0,08[ab]	16,86 ± 0,04[a]	7,19 ± 0,10[a]	2,34 ± 0,38[a]
T6	70,06 ± 0,45[a]	3,83 ± 0,03[a]	16,56 ± 0,32[ab]	7,32 ± 0,70[a]	2,20 ± 0,76[a]

Valores médios ± desvio padrão
[ab] Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. T1- Adicionado de antioxidante sintético (ES - Eritorbato de Sódio); T2 - Sem adição de antioxidante; T3 - Com adição de 0,5% de extrato de marcela (M); T4 - Com adição de 1,0% de extrato de marcela (M); T5 - Com adição de 0,5% de extrato de capim-limão (CL); T6 - Com adição de 1,0% de extrato de capim-limão (CL)

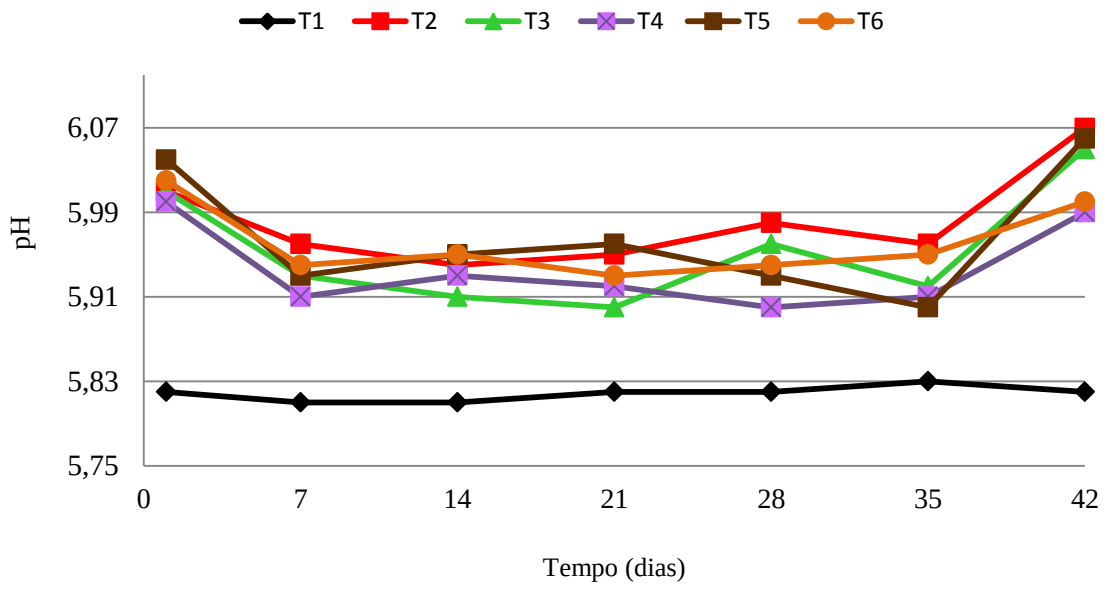
O teor de umidade, gordura e carboidratos, não apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos, fato que se atribui a formulação ser a mesma em todos os tratamentos.

3.2 Determinação de pH e Atividade de Água

Os resultados do efeito do extrato hidroalcoólico de marcela e capim-limão no pH de linguiça frescal de frango armazenada a 4ºC durante 42 dias são apresentados na Figura 1.

Os valores médios de pH obtidos ficaram na faixa entre 5,81 e 6,07 nos diferentes tratamentos analisados, apresentando diferença estatística significativa entre os tratamentos somente no vigésimo oitavo dia de armazenamento. O pH da linguiça além de exercer influência direta sobre sua conservação, está diretamente relacionado a sua coloração e sabor. O pH deve ser suficientemente ácido para facilitar a produção de óxido de nitrogênio a partir do nitrito que combinado com a mioglobina produzirá a coloração rósea típica da linguiça (Coventry & Hickey, 1991).

Figura 1: Valores médios de pH das amostras de linguiça de frango durante o período de armazenamento a 4 ºC (±1 ºC).



Valores médios ± desvio padrão de cada dia analisado
T1- Adicionado de antioxidante sintético (ES - Eritorbato de Sódio); T2 - Sem adição de antioxidante; T3 - Com adição de 0,5% de extrato de marcela (M); T4 - Com adição de 1,0% de extrato de marcela (M); T5 - Com adição de 0,5% de extrato de capim-limão (CL); T6 - Com adição de 1,0% de extrato de capim-limão (CL)

Percebe-se que o tratamento padrão (T1) foi o que apresentou menor pH ao longo do período de armazenamento e o tratamento controle o maior. Sabendo que o tratamento controle (T2) não tem adição de eritorbato de sódio, nem de extrato de marcela e capim-limão, pressupõe-se que a adição do antioxidante sintético contribuiu para a diminuição do pH, o que também foi observado por Soquetta et al. (2017) em patê de presunto adicionado de eritorbato de sódio e o pH encontrado foi de 5,6, já para o tratamento sem adição de antioxidante o valor foi de 6,1, demonstrando que a adição do antioxidante sintético também contribuiu para a redução do pH.

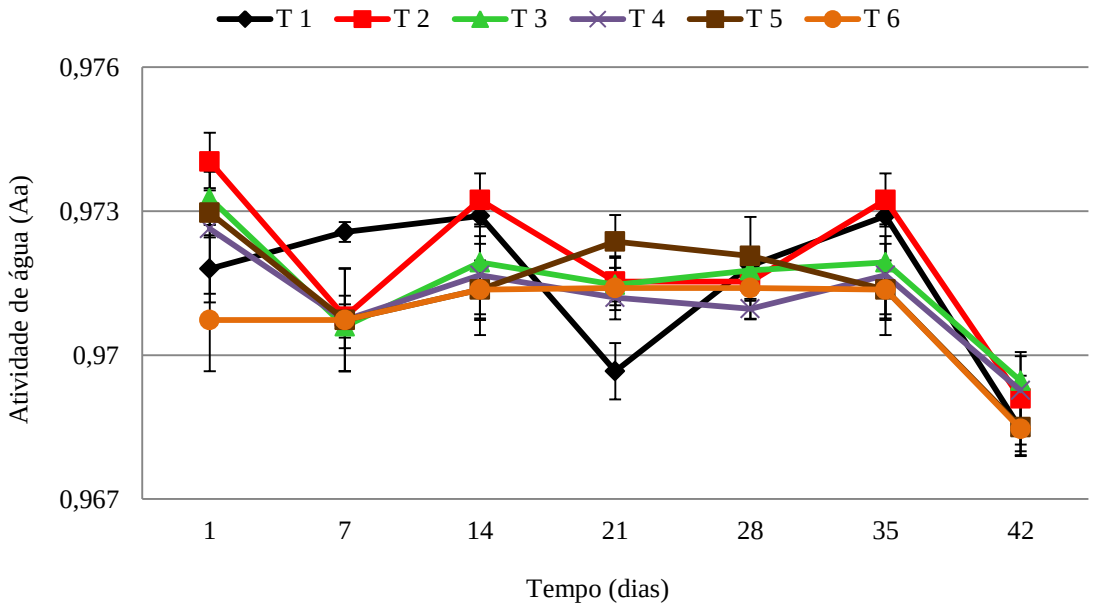
Os valores normais para coxa de frango são de pH entre 6,4 e 6,7 e também para carne de peito e coxa de frangos valores de 5,94 e 6,10, respectivamente (Olivo, 2006). Enquanto que para carne de sobrecoxa desossada manualmente, utilizadas neste estudo, pH de aproximadamente 5,8 a 6,2 (Beraquet, 2000). Portanto, os extratos adicionados mantiveram as linguiças dentro dos valores citados na literatura.

Ao final do armazenamento, o pH dos produtos elaborados sofreu um leve aumento devido a elevação nas contagens de microrganismos psicotróficos, produtores de proteases. Ao iniciar a produção de proteases pelas bactérias, estas passam a utilizar

aminoácidos como substrato de crescimento, ao invés de utilizarem a glicose, resultando o aumento do pH, devido a formação de amoníaco e aminas (Terra; Brum, 1988).

Os valores de atividade de água (Aa) das linguiças de frango (Figura 2) variaram de 0,96 a 0,97. Segundo Ribeiro e Saravalli (2004), os resultados da atividade de água mostram que as linguiças de frango são consideradas alimentos de alta atividade de água, o que favorece o crescimento de microrganismos. Observou-se diferença estatística entre os tratamentos somente no último dia de armazenamento, onde ocorreu uma leve tendência ao decréscimo nos valores. Esses resultados corroboram com Andrés (2005) que ao determinar a atividade de água em linguiças de frango com baixo teor de gordura, relatou declínio nos valores ao final do armazenamento. De acordo com Wilson e Demmig-Adams (2007), a quantidade de água presente no alimento pode afetar a estabilidade oxidativa dos lipídios e, segundo Dewi e Ismail (2010), a oxidação lipídica reduz o tempo de vida do produto e a qualidade nutritiva do mesmo. Desta forma, os fatores que garantem a segurança destes produtos são a manutenção a baixas temperaturas.

Figura 2: Valores médios de atividade de água (Aa) das amostras de linguiça de frango durante o período de armazenamento a 4 ºC (±1 ºC).



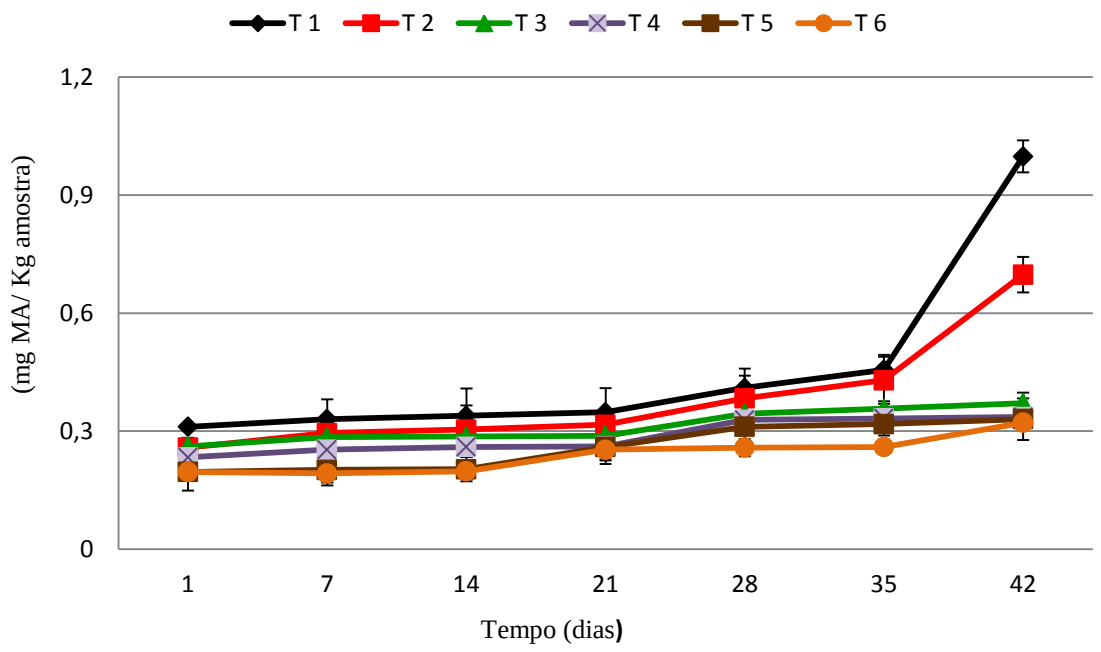
Valores médios ± desvio padrão de cada dia analisado
T1- Adicionado de antioxidante sintético (ES - Eritorbato de Sódio); T2 - Sem adição de antioxidante; T3 - Com adição de 0,5% de extrato de marcela (M); T4 - Com adição de 1,0% de extrato de marcela (M); T5 - Com adição de 0,5% de extrato de capim-limão (CL); T6 - Com adição de 1,0% de extrato de capim-limão (CL)

3.3 Oxidação lipídica- TBARS

Os extratos de marcela e capim-limão influenciaram de forma distinta a oxidação lipídica das amostras de linguiças de frango, durante o período de armazenamento refrigerado (Figura 3). Observa-se que os níveis de TBARS tenderam a aumentar ao longo do tempo. Resultado semelhante foi encontrado por Brannan (2008) que verificou aumento significativo nos valores de TBARS em carne de frango adicionada de extrato de semente de uva, durante armazenamento refrigerado. Os tratamentos com 0,5 e 1,0% de capim-limão mostraram os menores resultados para a oxidação lipídica das linguiças, durante todo o período de armazenamento, sendo 0,33 e 0,32 mg MDA/kg amostra, respectivamente.

Em comparação com o controle, os antioxidantes naturais empregados, foram eficientes em retardar a oxidação lipídica até os 42 dias da vida de prateleira, sendo que os extratos de marcela e capim-limão foram mais eficientes que o eritorbato de sódio (Figura 3). Isto demonstra que a dosagem testada foi suficiente para manter a estabilidade oxidativa das linguiças refrigeradas por 42 dias de armazenamento.

Figura 3: Valores médios de TBARS (mgMDA/kg de amostra) das amostras de linguiça de frango durante o período de armazenamento a 4 ºC (±1 ºC).



Valores médios ± desvio padrão de cada dia analisado
T1- Adicionado de antioxidante sintético (ES - Eritorbato de Sódio); T2 - Sem adição de antioxidante; T3 - Com adição de 0,5% de extrato de marcela (M); T4 - Com adição de 1,0% de extrato de marcela (M); T5 - Com adição de 0,5% de extrato de capim-limão (CL); T6 - Com adição de 1,0% de extrato de capim-limão (CL)

Já para o tratamento com eritorbato de sódio, pode-se observar que ocorreu um aumento na produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Este antioxidante, largamente utilizado na indústria cárnea, foi eficiente na inibição da oxidação lipídica até os 35 dias, contudo, aos 42 dias apresentou o maior valor de TBARS (0,99 mg MDA/kg amostra). Assim como observado neste estudo Capitani et al. (2009) observaram diminuta eficiência do eritorbato em evitar a formação de MDA em homogeneizado de carne de frango.

De acordo com Greene e Cumuze (1982) o limite máximo aceitável de malonaldeído em produtos cárneos é de 2,0 mgMDA/kg, acima do qual o *flavor* de oxidação começa a ser detectado sensorialmente.

3.4 Determinação da cor

Os resultados obtidos para a luminosidade (*L**), cor vermelha (*a**) e cor amarela (*b**) das linguiças de frango durante todo o período de armazenamento são apresentados na Tabela 3.

Para o parâmetro L*, observa-se que apenas no primeiro dia de armazenamento houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos. No final do armazenamento todos os tratamentos, inclusive o controle, apresentaram valores superiores para L* se comparado com o inicio do experimento. O aumento do valor de L* significa que a carne estava mais “clara”, como pode ser constatado no diagrama de cromaticidade do sistema CIELAB os valores de L* representam a porcentagem de luminosidade, variando de preto (0%) a branco (100%) (Ramos e Gomide, 2007).

Em relação ao parâmetro a*, apenas no dia 1 e dia 21 de armazenamento, nota-se diferença estatística ($p<0,05$) entre os tratamentos. Os valores de a* para todos os tratamentos apresentaram-se numericamente próximos. Pereira (2009) em seu estudo com antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada de ave, constatou que a média do período de armazenamento não houve diferença significativa para os valores de a* ($p<0,05$) entre os tratamentos com extrato de marcela, erva mate e da mistura destes dois extratos apresentando valores numericamente muito próximos.

O parâmetro b*, que varia de azul (-b*) a amarelo (+b*), apresentou valores maiores para o tratamento com adição de 1,0% de extrato de marcela (T4), assim como para o tratamento sem adição de antioxidante (T2) e para o tratamento adicionado de antioxidante sintético (T1), apresentando diferença significativa dos demais tratamentos

Tabela 3: - Valores médios para a luminosidade (L*), cor vermelha (a*) e cor amarela (b*) das amostras de linguiça de frango durante o período de armazenamento a 4 ºC (±1 ºC).

	Tempo de análise (dias)						
Parâmetro L*	**1**	**7**	**14**	**21**	**28**	**35**	**42**
T1 (ES)	50,03 ± 2,10[ab]	50,15 ± 1,63[a]	53,44 ± 1,86[a]	52,58 ± 1,87[a]	49,24 ± 2,57[a]	53,03 ±1,69[a]	53,46 ± 1,53[a]
T2 (Controle)	51,01 ± 1,43[ab]	50,80 ± 1,42[a]	51,81 ± 0,85[a]	51,13 ± 2,73[a]	51,58 ± 3,40[a]	51,63 ± 1,60[a]	52,91 ± 1,96[a]
T3 (0,5% M)	53,88 ± 3,01[a]	52,82 ± 1,39[a]	51,33 ± 1,87[a]	50,84 ± 1,23[a]	54,65 ± 2,88[a]	55,60 ± 2,51[a]	55,61 ± 1,77[a]
T4 (1,0% M)	50,79 ± 0,80[ab]	52,12 ± 2,38[a]	51,32 ± 2,42[a]	52,67 ± 2,11[a]	51,88 ± 2,47[a]	51,23 ± 1,17[a]	54,22 ± 3,86[a]
T5 (0,5 CL)	47,29 ± 3,18[b]	52,65 ± 3,29[a]	51,17 ± 1,94[a]	54,28 ± 3,20[a]	54,33 ± 1,02[a]	55,31 ± 0,91[a]	50,57 ± 1,97[a]
T6 (1,0% CL)	49,69 ± 1,25[ab]	53,81 ± 2,53[a]	50,44 ± 1,76[a]	55,34 ± 2,45[a]	54,81 ± 1,72[a]	54,91 ± 1,79[a]	55,27 ± 1,40[a]
Parâmetro a*							
T1 (ES)	13,70 ± 0,61[a]	14,11 ± 1,22[a]	12,8 ± 0,48[a]	14,44 ± 0,22[ab]	14,09 ± 1,29[a]	12,24 ± 245[a]	13,19 ± 2,04[a]
T2 (Controle)	12,57 ± 0,29[b]	12,63 ± 1,02[a]	10,58 ± 0,74[a]	12,84 ± 1,77[ab]	11,93 ± 1,76 a	12,09 ± 0,99[a]	12,39 ± 2,64[a]
T3 (0,5% M)	12,80 ± 0,85[b]	12,23 ± 1,97[a]	10,89 ± 1,54[a]	13,32 ± 0,95[ab]	10,17 ± 0,62[a]	13,62 ± 2,85[a]	12,31 ± 3,99[a]
T4 (1,0% M)	10,35 ± 0,46[b]	13,33 ± 1,33[a]	11,46 ± 0,14[a]	14,76 ± 1,24[a]	14,38 ± 1,15[a]	12,74 ± 0,82[a]	11,36 ± 1,76[a]
T5 (0,5 CL)	11,90 ± 1,31[ab]	13,06 ± 0,89[a]	11,89 ± 1,45[a]	11,23 ± 1,46[b]	11,76 ± 1,29[a]	13,66 ± 2,09[a]	11,1 ± 2,72[a]
T6 (1,0% CL)	11,95 ± 0,54[ab]	13,52 ± 1,69[a]	10,61 ± 0,52[a]	14,36 ± 0,90[ab]	12,28 ± 2,97 a	13,48 ± 1,16[a]	12,11 ± 1,82[a]
Parâmetro b*							
T1 (ES)	16,08 ± 0,58[ab]	16,81 ± 0,67[a]	16,56 ± 0,94[a]	17,42 ± 0,43[a]	16,23 ± 1,89[a]	15,01 ± 2,53[b]	17,14 ± 1,26[a]
T2 (Controle)	16,64 ± 0,69[a]	16,71 ± 0,61[a]	15,48 ± 0,53[a]	17,29 ± 1,21[a]	17,82 ± 0,78[a]	17,34 ± 1,59[ab]	17,22 ± 0,82[a]
T3 (0,5% M)	16,50 ± 1,79[a]	15,69 ± 2,75[a]	15,46 ± 0,72[a]	16,99 ± 0,86[a]	17,38 ± 1,75[a]	19,01 ± 0,22[a]	16,26 ± 1,23[a]
T4 (1,0% M)	12,71 ± 1,12[b]	16,98 ± 1,65[a]	16,69 ± 1,57[a]	17,59 ± 0,80[a]	18,08 ± 1,49[a]	17,21 ± 1,26[ab]	17,68 ± 1,44[a]
T5 (0,5 CL)	15,03 ± 1,39[ab]	17,06 ± 1,04[a]	15,12 ± 1,28[a]	18,28 ± 1,88[a]	18,20 ± 0,58[a]	18,41 ± 0,48[ab]	14,19 ± 3,02[a]
T6 (1,0% CL)	14,88 ± 1,71[ab]	16,7 ± 0,92[a]	14,92 ± 1,95[a]	18,17 ± 1,04[a]	17,13 ± 0,77[a]	18,07 ± 1,09[ab]	15,41 ± 1,03[a]

Valores médios ± desvio padrão de cada dia analisado

[ab] Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. T1- Adicionado de antioxidante sintético (ES - Eritorbato de Sódio); T2 - Sem adição de antioxidante; T3 - Com adição de 0,5% de extrato de marcela (M); T4 - Com adição de 1,0% de extrato de marcela (M); T5 - Com adição de 0,5% de extrato de capim-limão (CL); T6 - Com adição de 1,0% de extrato de capim-limão (CL)

no primeiro dia de armazenamento. Possivelmente, essa diferença observada no tratamento com 1,0% de marcela, é devido à adição do extrato que tem uma coloração amarela intensa, e consequentemente pode ter contribuído para o aumento da cor amarela nas linguiças de frango.

A tendência da cor amarela apresentada nos tratamentos com antioxidante sintético e o controle, ocorreram em virtude da oxidação de lipídios ter sido sempre maior do início ao final do período de armazenamento para esses tratamentos. As diferenças nos valores de *b** durante o período de estocagem podem ser relatadas pela intensidade do processo de oxidação que aparece durante o armazenamento que tende a aumentar a cor amarela de produtos pela rancidez (García-Esteban, Ansorena & Astiasarán, 2004).

3.5 Análises Microbiológicas

Segundo a RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001), que aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, a tolerância em embutidos frescais para *Staphylococcus* coagulase positiva e para *Clostridium* sulfito redutor a 46 ºC é de 3 x 10^3 UFC.g^{-1} (3,47 Log UFC/g) para coliformes a 45 ºC é de 5 x 10^3 (3,69 Log UFC/g) e para *Salmonella spp* é ausência em 25 g. Os resultados para *Staphylococcus* coagulase positiva, *Clostridium* sulfito redutor e coliformes a 45 ºC, apresentaram-se inferiores a 1 Log UFC.g^{-1} e ausência em 25 gramas de amostra para *Salmonella sp.*. Com base nos resultados obtidos pode-se notar que as linguiças de frango foram consideradas dentro dos limites permitidos pela legislação, demonstrando que o processamento foi realizado em condições adequadas de higiene e respeitando as boas práticas de fabricação.

3.6 Análise Sensorial

3.6.1 Teste de aceitação e intenção de compra

Os valores médios das notas atribuídas para os atributos cor, odor, sabor, textura e aparência global (Tabela 4) ficaram entre os escores 6 e 7, classificados como “gostei ligeiramente” e “gostei” na escala hedônica estruturada de nove pontos para os tratamentos avaliados.

Os atributos cor, textura e aparência global não apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos avaliados, demonstrando que não houve interferência da adição

das diferentes concentrações de extrato de marcela e capim-limão nas linguiças de frango. Quanto ao atributo odor, houve diferença estatística ($p<0,05$) entre os tratamentos, onde a linguiça de frango adicionada de 1,0% de extrato de capim-limão apresentou média superior pelos provadores. Para o atributo sabor, a linguiça de frango adicionada de antioxidante sintético e a adicionada de 0,5% de capim limão diferenciaram-se das demais com médias superiores pelos provadores. De acordo com Gomes & Negrelle (2003) estes resultados podem estar relacionados ao odor característico de limão presente nesta erva, além do sabor aromático e ardente (Gomes & Negrelle, 2003).

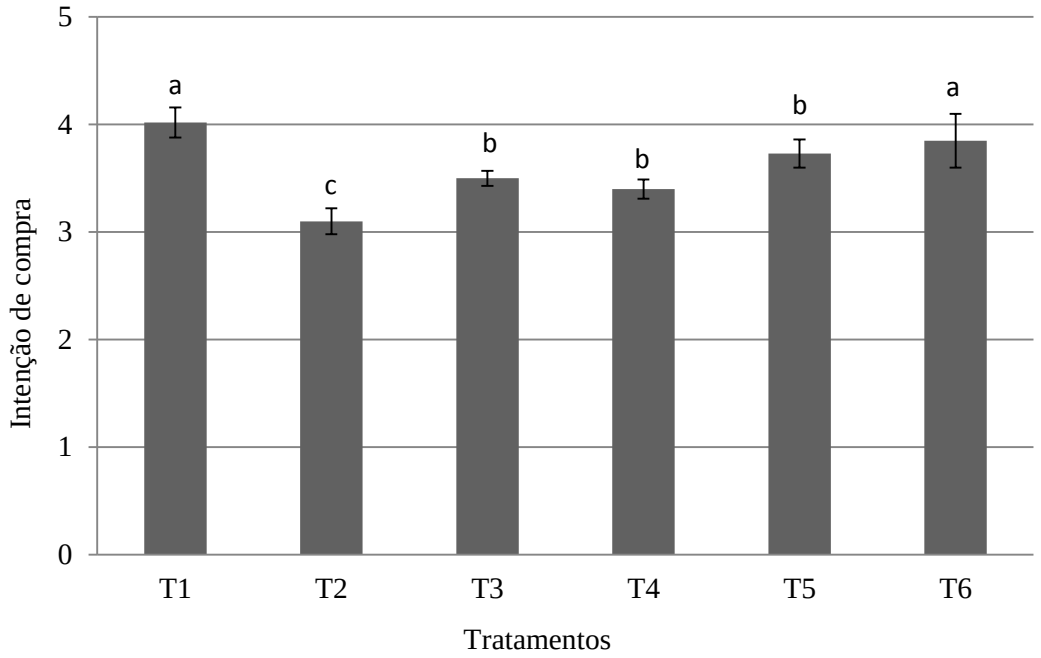
Tabela 4: – Médias das notas relativas às características sensoriais (cor, odor, sabor, textura e aparência global) das amostras de linguiça de frango refrigeradas no décimo dia de armazenamento a 4 ºC (±1 ºC).

Tratamentos	Cor	Odor	Sabor	Textura	Aparência
T1	$6,82 \pm 0,35^{a}$	$6,80 \pm 0,25^{b}$	$7,20 \pm 0,64^{a}$	$6,66 \pm 0,84^{a}$	$6,90 \pm 0,11^{a}$
T2	$6,55 \pm 0,37^{a}$	$6,61 \pm 0,43^{b}$	$6,28 \pm 0,22^{b}$	$6,31 \pm 0,50^{a}$	$6,16 \pm 0,26^{b}$
T3	$6,68 \pm 0,11^{a}$	$6,60 \pm 0,65^{b}$	$6,65 \pm 0,53^{b}$	$6,05 \pm 0,09^{b}$	$6,60 \pm 0,34^{a}$
T4	$6,40 \pm 0,20^{a}$	$6,60 \pm 0,74^{b}$	$6,39 \pm 0,15^{b}$	$6,20 \pm 0,18^{a}$	$6,45 \pm 0,15^{a}$
T5	$6,46 \pm 0,29^{a}$	$6,75 \pm 0,13^{b}$	$6,88 \pm 0,10^{a}$	$6,70 \pm 0,42^{a}$	$6,73 \pm 0,12^{a}$
T6	$6,88 \pm 0,15^{a}$	$7,44 \pm 0,11^{a}$	$6,57 \pm 0,09^{b}$	$6,30 \pm 0,29^{a}$	$6,70 \pm 0,18^{a}$

Valores médios ± desvio padrão de análises de 100 provadores.
[ab] Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. T1- Adicionado de antioxidante sintético (ES - Eritorbato de Sódio); T2 - Sem adição de antioxidante; T3 - Com adição de 0,5% de extrato de marcela (M); T4 - Com adição de 1,0% de extrato de marcela (M); T5 - Com adição de 0,5% de extrato de capim-limão (CL); T6 - Com adição de 1,0% de extrato de capim-limão (CL)
Escores: 1= desgostei muitíssimo; 2= desgostei muito; 3=desgostei moderadamente; 4= desgostei ligeiramente, 5= indiferente; 6= gostei ligeiramente; 7= gostei moderadamente; 8= gostei muito; 9= gostei muitíssimo.

De acordo com Santana et al. (2006) uma das maiores preocupações ao desenvolver um produto é verificar a intenção de compra pelo consumidor. Os resultados do teste de intenção de compra realizado no décimo dia de armazenamento das linguiças estão apresentados na Figura 4. A média do teste de intenção de compra ficou em torno de 4, equivalente ao termo “Provavelmente compraria” da escala. Não houve diferença estatística ($p<0,05$) entre o tratamento adicionado de antioxidante sintético e o tratamento com adição de 1,0% extrato de capim-limão. Isso demonstra que a adição do extrato de capim-limão ao nível de 1,0% não influiu no comportamento do consumidor em relação a compra do produto.

Figura 4: Médias das notas atribuídas a intenção de compra para as linguiças de frango refrigeradas armazenadas a 4ºC (±1 ºC) utilizando escala hedônica de 5 pontos.



Valores médios ± desvio padrão de análises de 100 provadores.
[ab] Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. T1- Adicionado de antioxidante sintético (ES - Eritorbato de Sódio); T2 - Sem adição de antioxidante; T3 - Com adição de 0,5% de extrato de marcela (M); T4 - Com adição de 1,0% de extrato de marcela (M); T5 - Com adição de 0,5% de extrato de capim-limão (CL); T6 - Com adição de 1,0% de extrato de capim-limão (CL)
Escores: 1 =Decididamente eu não compraria, 2=Provavelmente eu não compraria, 3= Talvez sim / Talvez não, 4= Provavelmente eu compraria, 5= Decididamente eu compraria

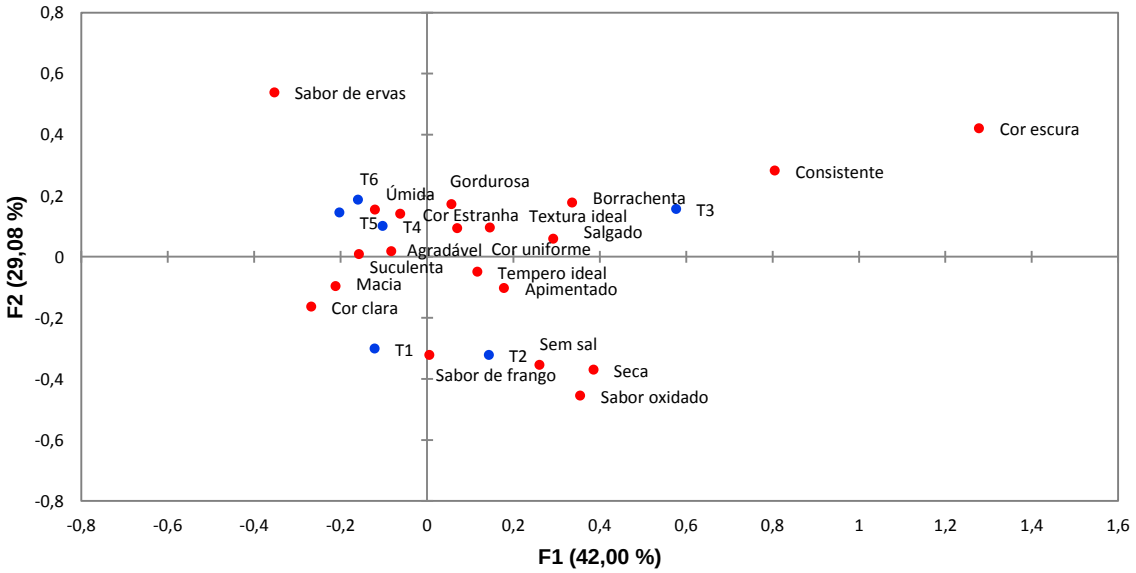
3.6.2 Avaliação do check-all-which-apply (CATA)

Análise de correspondência (CA) usada para avaliar os descritores gerados pelo questionário CATA está apresentado na Figura 5. A CA explicou 71,08% da variância total, com 42,0% e 29,08% na primeira e segunda dimensão, respectivamente. As linguiças foram separadas no mapa sensorial em seis grupos distintos. O primeiro grupo consistiu do tratamento contendo adição de antioxidante sintético (T1); o segundo grupo foi caracterizado pelo tratamento sem adição de antioxidantes (T2); o terceiro e quarto grupos continham 0,5 e 1,0%, respectivamente, de extratos de marcela (T3 e T4) e o quinto e sexto grupos continham 0,5 e 1,0%, respectivamente, de extratos de capim-limão (T5 e T6). O tratamento com adição de antioxidante sintético (T1) foi caracterizado pelos descritores suculento, macio e cor clara. O tratamento controle (T2) caracterizou-se pelos atributos sabor de frango, tempero ideal, sem sal, apimentado, seco e gosto oxidado. Já o tratamento com adição de 0,5% de extrato de marcela (T3) foi caracterizado pelos atributos cor escura, cor uniforme, consistente, emborrachado, salgado, gorduroso e textura ideal. Os tratamentos com adição de 1,0 % de

extrato de marcela (T4) e 0,5 e 1,0%, respectivamente, (T5 e T6) de extratos de capim-limão caracterizaram-se pelos atributos sabor de erva, cor estranha, úmido, suculento e agradável.

Assim, os resultados da CATA mostraram que o tratamento controle sem adição de antioxidante (T2) e o tratamento com 0,5% de extrato de marcela (T3) foram os tratamentos que receberam mais descritores negativos pelos provadores. A presença do atributo sabor oxidado encontrado no grupo controle (T2), está relacionado ao grau de oxidação lipídica das linguiças, visto que neste grupo não foram empregados antioxidantes. Já os tratamentos com antioxidante sintético (T1), e os adicionados de 1,0 % de extrato de marcela (T4) e 0,5 e 1,0%, respectivamente, (T5 e T6) de extrato de capim-limão foram os grupos que receberam os melhores atributos sensoriais.

Figura 5: Representação das amostras e os termos na primeira e segunda dimensões da análise de correspondência realizada em questões de dados *check-all-which-apply* (CATA).



T1- Adicionado de antioxidante sintético (ES - Eritorbato de Sódio); T2 - Sem adição de antioxidante; T3 - Com adição de 0,5% de extrato de marcela (M); T4 - Com adição de 1,0% de extrato de marcela (M); T5 - Com adição de 0,5% de extrato de capim-limão (CL); T6 - Com adição de 1,0% de extrato de capim-limão (CL)

4 CONCLUSÃO

As linguiças de frango apresentaram características físico-químicas e microbiológicas dentro dos padrões de Identidade e Qualidade do Produto.

Os níveis de TBARS demostraram que os extrato de marcela e capim-limão foram eficazes em retardar a oxidação lipídica das linguiças de frango armazenadas a 4 ºC, sendo a

linguiça adicionada de 1,0% de capim-limão a que apresentou a menor oxidação lipídica ao longo dos 42 dias de armazenamento.

As linguiças ao longo do armazenamento apresentaram-se mais claras, o parâmetro b* mostrou oxidação nos tratamentos com antioxidante artificial (T1) e no sem antioxidante (T2), corroborando com os resultados de TBARS.

A análise sensorial mostrou que as linguiças foram classificadas como “gostei ligeiramente” a “gostei” na escala estruturada de 9 pontos. O teste de intenção de compra mostrou que os provadores comprariam as linguiças. Os resultados da CATA mostraram que o tratamento com antioxidante sintético, e os tratamentos com adição de 1,0 % de extrato de marcela e 0,5 e 1,0%, de extrato de capim-limão foram os grupos que receberam os melhores atributos sensoriais, sendo os mais aceitos.

A utilização de extrato de marcela e capim-limão é viável como ingrediente em produtos cárneos visto que pode servir como antioxidante natural sem alterar a qualidade dos produtos.

REFERÊNCIAS

Andrés, S. C., García, M. E., Zaritzky, N. E., & Califano, A. N. (2005). Storage stability of low-fat chicken sausages. *Journal of Food Engineering*, 72(4), 311-319.

AOAC (Association of Official Analtical Chemists) (1995). *Official Methods of Analysis of the AOAC Internacional(*16th ed.) (Washinton: USA).

AOAC (Association of Official Analtical Chemists) (2002) *Official Methods of Analysis of the AOAC Internacional(*17th ed.).

Ares, G., Barreiro, C., Deliza, R., Giménez, A., & Gámbaro, A. (2010). Application of a check-all-that-apply question to the development of chocolate milk desserts. Journal of Sensory Studies, 96, 47–55.

Beraquet, N, J.(2000). Carne mecanicamente separada de aves. In: *Seminário e curso teórico prático agregando valor a carne de aves*, 1, 2000, Campinas. Anais... Campinas: ITAL 2000, p. 17-19.

Brannan, R. G. (2008) Effect os grape seed extract on physicochemical properties of ground, salted, chicken thigh meat during refrigerated storage at different relative humidity levels. *Journal of Food Science*, 73(1), 36-40.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa. In: nº 62, de 26 de agosto de 2003. Dispõe sobre Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília: *Diário Oficial da União*, ago., 2003.

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

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.4, de 31 de março de 2000. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada, de mortadela, de linguiça e de salsicha. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, p.6, 05 abr. 2000. Seção 1.

Capitani, C. D., Carvalho, A.C.L., Rivelli, D.P., Barros, S.B.M., Castro, I.A. (2009). Evaluation of natural and synthetic compounds according to their antioxidant activity using a multivariate approach. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(1), 1090-1099.

Cavalheiro, C.V. *Extração de Compostos Fenólicos Assistida por Ultrassom e Determinação de Ácidos Graxos e Minerais em Folhas de Olea Europaea L*. 2013. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

Coventry, J. & Hickey, M.W. (1991). Growth characteristics of meat starter cultures. *Meat Science*, 30(1), 41-48.

Dewi, M., Huda, N., & Ismail, N. (2010). Use of fresh garlic and garlic powder in duck sausage during refrigerated storage. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 3(5), 526-524.

Dutcosky, S.D. *Análise sensorial de alimentos*. 3 ed. Curitiba: Champagnat, 2011. 425p.

Falowo, A.B., Fayemi, P.O. & Voster, M. (2014). Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 64(1), 171-181.

García-Esteban, M., Ansorena, D. & Astiasarán, I. (2004). Comparison of modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period storage of dry-cured ham: effects on colour, texture and microbiological quality. *Meat Science*, 67(1), 57-63.

Gomes, E.C. & Negrelle, R.R.B. 2003. Cymbopogon citratus (D.C.) Stapf: Aspectos botânicos e ecológicos. *Visão Acadêmica*, 4(2), 137-144.

Greene, B.E. & Cumuze, T.H. (1982). Relationship between TBA numbers and inexperienced panelist's assessments of oxidized flavor in cooked beef. *Journal of Food Science, 47*(1), 52-58.

Karakaya, M., Bayrak, E. & Ulusoy, K. (2011). Use of natural antioxidants in meat and meat Products. *Journal of Food Science and Engineering*, 98(1), 21-33.

Meilgaard, M. C., Carr, T., & Civille, G. V. *Sensory evaluation techniques* (4th ed.). Boca Raton: CRC Press. 2006. 464p.

Merril, A.L. & Watt, B.K. *Energy value of foods*: basis and derivation. Washington: United States Department of Agriculture, 1973. 105p.

Olivo, R. *Alterações Oxidativas em produtos cárneos*. In. Olivo, R. O Mundo do Frango (1th ed.) Criciúma, SC: Ed Do Autor, 2006. 29(1), 533-542.

Pereira, M.G. *Aplicação de Antioxidantes Naturais em Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Ave*. 2009. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

Raharjo, S., Sofos, J. N. & Schmidt, G. R. (1992). Improved speed, specifity, and limit of determination of an aqueous acidextraction thiobarbituric acid – C18 method for measuring lipid peroxidati on in beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(1), 2182- 2185.

Ramos, E. M. & Gomide, L. M. A. *Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias*. Viçosa, MG: UFV, 2007, 599 p.

Reyes-Caudillo, E., Tecante, A. & Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (Salvia hispanica L.) seeds. *Food Chemistry*,107(1), 656- 663.

Ribeiro, E.P. & Seravalli, E.A.G. *Química de alimentos*. São Paulo: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004. 184p.

Rocha-Garcia, C.E., Youssef, E.Y., Souza, N.E., Matsushita, M., Figueiredo, E. & Shimokomaki, M. (2003). Preservation of spent leghorn hen meat by a drying and salting process. *Journal of Applied Poultry Research*, 12(1),335-340.

Salgueiro, A.C.F., Folmer, V., Rosa, H.D., Costa, M.T., Boligon, A.A., Fávero, R.P., Roos, D.H. & Puntel, G.P. (2016). In vitro and in silico antioxidant and toxicological activities of Achyrocline satureioides. *Journal of Ethnopharmacol*, 194(1), 6-14.

Santana, L.R.R., Santos, L.C.S., Natalicio, M.A., Mandragon Bernal, O.L., Elias, E.M., Silva, C.B., Zepka, L.Q., Martins, I.S.L., Vernaza, M.G., Castillo-Pizarro, C. & Bolini, H.M.A. (2006). Perfil Sensorial de Iogurte Light, sabor pêssego. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(3), 619-625.

Silva, M.L.C., Costa, R.S., Santana, A.S. & Koblitz, M.G.B. (2010). Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3), 669-682.

Soquetta, M.B., Monteiro, S.S., Boeira, C.P., Copetti, C., Polli, V.A., Rosa, C.S. & Terra, N.N. (2017). Development and Quality of Ham Pâté with Added Natural Antioxidant Kiwi Fruit (Actinidia deliciosa) Skin, *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 7(1) 1-9.

Stone, H., Bleibaum, R. N., & Thomas, H. A. *Sensory evaluation practices* (4th ed.). New York: Academic Press. 2012. 446p.

Tavares, F., Costa, G., Francisco, V., Liberal, J., Figueirinha, A., Lopes, M.C., Cruz, M.T. & Batista, M.T. (2014). Cymbopogon citratus industrial waste as a potential source of bioactive compounds. *Journal of Science and Food Agriculture*, 95(13), 2652-2659.

Terra, N.N. & Brum, M.A.R. C*arne e seus derivados - Técnicas de Controle de Qualidade*. São Paulo: Ed. Nobel. 1998. 121p.

Veeck, A.P.L., Klein, B., Ruviaro, A.R., Quatrin, A., Ferreira, L.F., Daniel, A.P., Piccolo, J., Oliveira, M.S., Mallmann, C.A., Heinzmann, B.M. & Emanuelli, T. *(2015).*

Estabilidade lipídica de filés de carpa húngara congelados tratados com extratos de Lippia alba. *Ciência Rural*, 45(6),1113-1119.

Viera, V.B. *Compostos Bioativos, Atividade Antoxidante e Antimicrobiana na Casca de Cebola Roxa (Allium cepa l.) Submetidos a Diferentes Métodos de Extração.* 2016. 123 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

Vidal, L., Tárrega, A., Antúnez, L., Ares, G., & Jaeger, S. R. (2015). Comparison of correspondence analysis based on Hellinger and chi-square distances to obtain sensory spaces from check-all-that-apply (CATA) questions. *Food Quality and Preference*, 43, 106–112.

Wilson, E.A. &Demmig-Adams, B. (2007). Antioksidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties of garlic and onions. *Nutritive and Food Science*, 37(3), 178-183.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi realizada a extração de compostos bioativos de marcela (*Achyrocline satureioides)* e capim-limão (*Cymbopogon citratus)* através de diferentes métodos e condições de extração. Após a descoberta dos extratos com maiores características antioxidantes de cada planta estes foram aplicados em linguiças de frango, caracterizando as mesmas quanto a composição centesimal, pH, cor, oxidação lipídica, estabilidade microbiológica e atributos sensoriais durante o armazenamento.

Para os extratos de marcela obtidos pelo método convencional a temperatura de 20 ^{o}C e 60 ^{o}C apresentaram maiores teores de fenólicos comparados a temperatura de 40 ^{o}C, para flavonoides o aumento da temperatura não influenciou. Já para os extratos de capim-limão o extrato obtido pelo método convencional a temperatura de 20 ^{o}C apresentou maior teor de fenólicos comparado as demais temperaturas avaliadas neste método, para flavonoides o aumento da temperatura também não influenciou. Para os extratos de marcela e capim-limão obtidos pelo método de ultrassom a temperatura de 60 ^{o}C mostrou maior teor de fenólicos, da mesma forma para flavonoides o aumento da temperatura influenciou positivamente. Em contra partida Migliato et al. (2011) investigaram a influência da temperatura na extração de flavonoides de folhas de *Syzygium cumini* (L.) *Skeels*, e observaram que o aumento da temperatura afetou de forma significativa a extração de flavonoides. Em outro estudo, Azevedo (2010) verificou que as condições ótimas de operação para a obtenção desses compostos estão na faixa de temperatura entre 50 °C a 60 °C. Tabaraki et al. (2012) corroboram ao relatarem que a temperatura influencia o processo de extração, uma vez que o calor torna a parede celular mais permeável, aumenta a solubilidade dos compostos e o coeficiente de difusão do solvente.

Diferentes técnicas são usadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro* a fim de permitir a seleção de substâncias e matrizes puras com esta propriedade. No presente estudo, as atividades antioxidantes dos extratos de marcela e capim-limão foram avaliadas pelos seguintes métodos: FRAP, DPPH e ORAC. Os resultados mostraram que na extração pelo método ultrassom à temperatura de 60 ^{o}C o IC_{50} do extrato de marcela foi menor, consequentemente a elevação da temperatura aumentou a atividade antioxidante, já para o capim-limão a extração convencional a 60 °C mostrou-se mais eficiente. A atividade antioxidante pelo FRAP no método convencional para os extratos de marcela e capim-limão

não sofreram influencia nas temperaturas de 20 ^{o}C e 40 ^{o}C, porém houve aumento da atividade na temperatura de 60 ^{o}C. Para a extração por ultrassom não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as temperaturas testadas para ambas às ervas. Para o método de ORAC a temperatura que favoreceu a extração dos compostos bioativos da marcela e capim-limão foi de 60 ^{o}C pela extração por ultrassom.

A atividade antioxidante máxima pelo DPPH para a marcela foi maior no método ultrassom a 60 °C. Já para o capim-limão o DPPH foi maior no método convencional nas temperaturas de 20 e 60 ^{o}C. Segundo Melo et al. (2008) a capacidade antioxidante pode ser considerada forte, quando o percentual de sequestro do radical DPPH apresentar valores acima de 70%, e moderado quando atingir valores entre 50 e 70%. Com isso, todos os extratos de marcela obtidos possuem atividade antioxidante forte e os extratos de capim-limão obtidos pelo método convencional possuem atividade antioxidante forte, enquanto que os obtidos pelo método ultrassom possuem atividade intermediária.

O extrato de marcela apresentou inibição frente a todas as cepas avaliadas, *Salmonella sp.* (10,25±0,24), *Staphylococcus aureus* (21,70±0,20) *e Escherichia coli* (13,40±0,15), assim como o extrato de capim-limão, *Salmonella sp.* (10,02±0,04), *Staphylococcus aureus* (10,60±0,27) *e Escherichia coli* (9,30±0,14). Segundo Mothana & Lindequist (2005), halos de inibição de 8 a 13 mm de tamanho são considerados extratos com poder de ação moderadamente ativos, já halos de inibição >14 mm de tamanho são extratos muito ativos. O extrato de marcela é muito ativo frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e moderadamente ativo frente a *Salmonella sp.*. O extrato de capim-limão pode ser considerado com ação moderada frente a todas as cepas analisadas. De acordo com Souza et al. (2002) e Lambert et a. (2001), os resultados deste estudo sugerem que os componentes químicos das plantas sejam os responsáveis por tal ação frente às bactérias analisada sendo, para a marcela, os flavonóides, quercetina, 3-O-metilquercetina e luteolina e para o capim-limão a presença do citral (composto formado pela mistura dos isômeros geranial e neral).

As linguiças de frango apresentaram características físico-químicas e microbiológicas dentro dos padrões adequados pela legislação brasileira. Em relação a umidade, gordura e carboidratos, este estudo não encontrou diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos. Possivelmente os valores aproximados devem-se a elaboração do produto que partiu de uma mistura homogênea com quantidades iguais de matéria-prima e ingredientes.

Os valores médios de pH obtidos ficaram na faixa entre 5,81 e 6,07 nos diferentes tratamentos analisados, apresentando diferença estatística significativa entre os tratamentos somente no dia 28° dia de armazenamento. Os valores normais para coxa de frango são de pH

entre 6,4 e 6,7 e também para carne de peito e coxa de frangos valores de 5,94 e 6,10, respectivamente (Olivo, 2006). Enquanto que para carne de sobrecoxa desossada manualmente, utilizadas neste estudo, um pH de aproximadamente 5,8 a 6,2 (Beraquet, 2000). Portanto, os resultados de pH mantiveram-se em media dentro dos valores normais citados pela literatura.

Os valores de atividade de água (Aa) das linguiças de frango variaram de 0,96 a 0,97. Segundo Ribeiro e Saravalli (2004), os resultados da atividade de água mostram que as linguiças de frango são consideradas alimentos de alta atividade de água, o que favorece o crescimento de microrganismos. Observou-se diferença significativa, entre os tratamentos, somente no último dia de armazenamento, onde ocorreu uma leve tendência ao decréscimo nos valores. Esses resultados corroboram com Andrés (2005) que ao determinar a atividade de água em linguiças de frango com baixo teor de gordura, relatou declínio nos valores ao final do armazenamento.

Os níveis de TBARS tenderam a aumentar ao longo do tempo. Resultado semelhante foi encontrado por Brannan (2008) que verificou aumento significativo nos valores de TBARS de carne de frango, durante armazenamento refrigerado. Os tratamentos com 0,5 e 1,0% de capim-limão obtiveram os menores resultados para a oxidação lipídica das linguiças de frango, durante todo o período de armazenamento, a linguiça de frango adicionada de 1,0% de capim-limão apresentou a menor oxidação lipídica após os 42 dias de armazenamento.

No final do armazenamento todos os tratamentos, inclusive o controle, apresentaram valores superiores para *L** se comparado com o início do experimento, indicando um produto mais claro. O comportamento do parâmetro de cor b* corrobora com os valores de TBARS, pois os tratamentos com adição de antioxidante sintético (T1) e sem adição de antioxidante (T2) foram os que apresentaram maior oxidação lipídica. O processo de oxidação tende a aumentar a cor amarela de produtos pela rancidez (GARCÍA-ESTEBAN; ANSORENA; ASTIASARÁN, 2004).

Os valores obtidos para *Staphylococcus* coagulase positiva, *Samonella sp.*, *Clostridium* sulfito redutor e coliformes fecais apresentaram-se dentro dos limites de tolerância estabelecidos pela RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001, para todos os tratamentos, demonstrando que o processamento foi realizado em condições adequadas de higiene e respeitando as boas práticas de fabricação (BRASIL, 2001).

A análise sensorial mostrou que as linguiças foram classificadas como “gostei ligeiramente” a “gostei” na escala estruturada de 9 pontos. O teste de intenção de compra mostrou que os provadores comprariam as linguiças. Os resultados da CATA mostraram que

o tratamento com antioxidante sintético, e os tratamentos com adição de 1,0 % de extrato de marcela e 0,5 e 1,0%, de extrato de capim-limão, foram os grupos que receberam os melhores atributos sensoriais, sendo os mais aceitos.

A utilização de extrato de marcela e capim-limão é viável como ingrediente em produtos cárneos visto que pode servir como antioxidante natural sem alterar a qualidade dos produtos.

6 CONCLUSÃO

De um modo geral, a extração assistida por ultrassom pode ser melhor para obtenção de extratos de marcela, que são ricos em compostos bioativos com alta atividade antioxidante. Para o capim-limão a extração convencional foi melhor na obtenção desses compostos. Os resultados demonstram ainda que a temperatura de 60 ° C apresentou maior rendimento de extração para ambas as ervas.

A marcela e o capim-limão apresentam ação antimicrobiana frente a cepas de *Salmonella sp., Escherichia coli,* e *Staphylococcus aureus*. A avaliação da capacidade antimicrobiana em linguiça frescal de frango do extrato de capim-limão demonstrou que a concentração de 1,0%, prolongou a vida de prateleira do produto até o vigésimo primeiro dia quanto o crescimento de aeróbios mesófilos e protegeu contra o crescimento de bactérias psicotróficas durante todos os 42° dias de armazenamento do produto.

As linguiças de frango apresentaram características físico-químicas e microbiológicas dentro dos padrões adequados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Não houve interferência da adição dos extratos sobre pH e atividade de água das linguiças de frango em relação ao controle.

Os níveis de TBARS demostraram que os extrato de marcela e capim-limão foram eficazes em retardar a oxidação lipídica das linguiças armazenadas a 4 ºC, sendo a linguiça de frango adicionada de 1,0% de capim-limão a que apresentou a menor oxidação lipídica após os 42 dias de armazenamento.

No final do armazenamento todos os tratamentos, inclusive o controle, apresentaram valores superiores para *L**, indicando um produto mais claro. O parâmetro b* mostrou oxidação nos tratamentos com antioxidante artificial e no sem antioxidante corroborando com os resultados de TBARS.

Os valores obtidos para *Staphylococcus* coagulase positiva; *Samonella sp.; Clostridium* sulfito redutor e coliformes fecais apresentaram-se dentro dos limites de tolerância estabelecidos pela RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para todos os tratamentos.

A análise sensorial mostrou que as linguiças foram classificadas como “gostei ligeiramente” a “gostei” na escala estruturada de 9 pontos. O teste de intenção de compra mostrou que os provadores comprariam as linguiças. Os resultados da CATA mostraram que o tratamento com antioxidante sintético, e os tratamentos com adição de 1,0 % de extrato de

marcela e 0,5 e 1,0%, de extrato de capim-limão foram os grupos que receberam os melhores atributos sensoriais, sendo os mais aceitos.

Desse modo, devido o baixo custo de obtenção e a grande disponibilidade na flora, a marcela e o capim-limão podem ser considerados uma promissora fonte natural de obtenção de extratos ricos em compostos antioxidantes, sendo viáveis como ingredientes em produtos cárneos visto que podem servir como antioxidantes naturais sem alterar a qualidade dos produtos.

REFERÊNCIAS

AMAROWICZ, R.A.; PEGG, R.; RAIM-MOHADDAM, P.; BRAL, B.; WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, v.84, n.4, p.551- 62, 2004

ANDRÉS, S.C.; GARCÍA, M.E.; ZARITZKY, N.E.; CALIFANO, A.N. Storage stability of low-fat chicken sausages. **Journal of Food Engineering**, v.72, n.4, p. 311-319, 2005.

ANGELINI, M. F. C. **Desenvolvimento do produto de conveniência Quenelle de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. 160 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2010.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos:** teoria e prática. 4. ed. Viçosa: UFV, 2008. 596 p.

AZEVEDO, J.C.S. **Estratégias de obtenção do corante do jambo vermelho (*Syzygium malaccense*) e avaliação de sua funcionalidade.** 2010. 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

BAUER, A.K.; DWYER-NIELD, L.D.; HANKIN, J.A.; MURPHY, R.C.; MALKINSON, A.M. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. **Toxicology,** v.169, n.1, p.1-15, 2001.

BERAQUET, N,J. Carne mecanicamente separada de aves. In: **Seminário e curso teórico prático agregando valor a carne de aves**, 1, 2000, Campinas. Anais... Campinas: ITAL, 2000, p. 17-19

BRANNAN, R. G. Effect os grape seed extract on physicochemical properties of ground, salted, chicken thigh meat during refrigerated storage at different relative humidity levels. **Journal of Food Science**, v.73, n.1, p. 36-40, 2008.

BLASINA, M.F., VAAMONAE L., MORQUIO A., ECHEVERY C., ARREDONDO F., DAJAS F. **Differentiation induced by Achyrocline satureioides (Lam) infusion in Pc 12 cells**. v. 23, n.9, p.1263-1269, 2009.

BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to food borne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 1/2, p. 9-25, 1996.

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

BRASIL. Instrução Normativa n.4, de 31 de marco de 2000. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada, de mortadela, de linguica e de salsicha. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p.6, 05 abr. 2000. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Métodos analíticos oficiais para analises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Instrução Normativa n° 62, de 26/08/2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA**. Rio de Janeiro, 1952.

BRASIL. **Regulamento Técnico - Aditivos Alimentares. Portaria SVS/MA N° 540** de 21 de Outubro de 1997.

CAMPAGNOL, P.C.B.; FRIES, L.L.M.; TERRA, N.N.; SANTOS, B.A.; FURTADO, A.S.; TONETO, E.R.L.; CAMPOS, R.M.L. The influence of Achyrocline satureioides ("Marcela") extract on the lipid oxidation of salami. **Ciência Tecnologia em Alimentos**, v.31, n.1, p.101-105, 2011.

CAMPOS, G. C. M.; TOLEDO, M. C. F. Determinação de BHA, BHT e TNHQ em óleos e gorduras por cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Brazilian Journal of food Technology**, v.3, p.65-71, 2000.

CAPRILES, V.D.; SOARES, R.A.M.; ARÊAS, J.A.G. Storage stability of snacks with reduced saturated and trans fatty acids contentes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.3, p.690-695, 2009.

CASTERA-ROSSIGNOL, A.; BOSQUE, F. Nouvelle approche des anti-oxydants. OCL. **Oléagineux, corps gras, lipides,** v.1, p.131-143, 1994.

CHEVALLIER, I.; AMMOR, S.; LAGUET, A.; LABAYLE, S.; CASTANET, V.; DUFOUR, E.; TALON, R. Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. **Food Control**, v. 17, n. 6, p. 446-453, 2006.

COSGROVE, J. P.; CHURCH, D. F.; PRYOR, W. A.; The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. **Lipids**, v. 22, n. 5, p. 299-304, 1987.

GANJEWALA, D.; LUTHRA, R. Essential oil biosynthesis and regulation in the genus Cymbopogon. **Nat. Prod. Commun**. v.5; p.163–172, 2010.

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

GEORGANTELIS, D.; AMBROSIADIS, I. KATIKOU, P.;BLEKAS, G.; GEORGAKIS, S. A. Effects of rosemary extract, chitosan and a-tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. **Meat Science**, v. 76, p. 172-181, 2007.

GRAY, J.I; GOMAA, E.A.; BUCKLEY, D.J.. Oxidative quality and shelf life of meats. **Meat Science,** v.43, n.8, p.111-123, 1996.

HAMAMA, A. A., NAWAR, W. W. Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 6, p. 1063-1069, 1991.

HARBORNE, J.B.; WILLIANS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

JADHAV, S. J.; NIMBALKAR, S. S.; KULKARNI, A. D.; MADHAVI, D. L.; RAJALAKSHMI, D.; NARASIMHAN, S.; In **Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives;** Madhavi D. L., Deshpande S. S., Salunkhe D. K., Ed.; Marcel Dekker Inc.; New York 1996; p. 5.

KANATT, S.R.; CHAWLA, S.P; SHARMA, A. Antioxidant and Radio-Protective Activities of Lemon Grass and Star Anise Extracts. **Food Bioscience**, v.6, p.24-30, 2014.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J. . Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, timol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, n .3, p. 453- 462, 2001.

LIMA, S.N.; OLIVEIRA, C.C.; CASTILHO, E.A.; DAMASCENO, K.A.; ALMEIDA, P.L.; OLIVEIRA, S.C.; CAMPAGNOL, P.C.B. Effect of Marcela extract (*Achyroclines satureiodes*) on the shelf life of minced tilapia (*Oreochromis niloticus*) sausages. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v.26, n.2, p.140-147, 2017

MARANGONI, C.; MOURA, N. F. Sensory profile of Italian salami with coriander (*Coriandrum sativum L.*) essential oil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 119-123, 2011.

MELO, A.E.; MACIEL, M.I.S.; DE LIMA, V.L.A. G.; DO NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de frutas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 193-201, 2008.

MIGLIATO, K.F.; CORREA, M.A.; SALGADO, H.R.N.; TOGNOLLI, J.O.; SACRAMENTO, L.V.S.; MELLO, J.C.P.; GIANNINI, M.J.S.M.; ALMEIDA, A.M.F.; PIZZOLITO, A.C. Factorial design of the optimization extraction of ***Syzygium cumini (L.) Skeels*** fruits. **Química Nova**, v.34, n.4, p.695-699, 2011.

MOTHANA, R.A.A.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. **Journal of Ethnopharmacology Etnopharmacology**, v. 96, p. 177-181, 2005.

NEGRELLE, R.R.B.; GOMES, E.C. *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf: chemical composition and biological activities. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.9, p.80–92, 2007.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O.; Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química nova**, v. 32, n. 3, p.689-702, 2009.

OLIVEIRA, M. J.; ARAÚJO, W. M. C.; BORGO, L. A. Quantificação de nitrato e nitrito em linguiças do tipo frescal. **Food Science and Technology**, v. 25, n. 4, p. 736-742, 2005.

OLIVO, R. **Alterações Oxidativas em produtos cárneos**. In. Olivo, R. O Mundo do Frango (1th ed.) Criciúma, SC: Ed Do Autor, 2006. 29(1), 533-542.

OLORUNSANYA, A. O.; OLORUNSANYA, E. O.; ALIU, O. T.; KAYODE, R. M. O. Effects of different species of pepper (C*apsicum*) on oxidative stability of raw and cooked pork patties. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.8, n.10, p.1588-1591, 2009.

OMURA, K. Antioxidant synergism between butylated hydroxy anisole and butylated hydroxyl toluene. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 72, n. 12, p. 1565–1570, 1995.

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

PALEZI, S. C. **Embutido Emulsionado a Base de Pescado (*Micropogonias furnierii*) com Adição de Isolado Proteico de Pescado e Antioxidante Natural de Marcela (*Achyrocline satureioides*).** 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

PEREIRA, M. P. **Aplicação de Antioxidantes Naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de ave.** 2009. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2009.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1.035-1.042, 2000

PIOVESAN, N.; VIEIRA, V. B. ; BOEIRA, C. P. ; TERRA, N.N ; MARTINS, L. L. . Impacto da adição de extrato natural de marcela (*Achyrocline satureioides*) na oxidação lipídica de linguiça de frango. **Higiene Alimentar**, v. 31, p. 1637-1641, 2017.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 43p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2009.

QUEIROZ, Y.U.; DAUD, K.O.; SOARES, R. A.M.; SAMPAIO, G.R.; CAPRILES, V.D.; TORRES, E.A.F.S. Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas de hambúrgueres com reduzidos teores de gordura e de colesterol. **Revista Nacional de Carne**, v. 338, n. 2, p. 84-89, 2005.

RABBANI, S.I.; DEVI, K.; KHANAM, S.; ZAHRA, N. Citral, a component of lemongrass oil inhibits the clastogenic effect of nickel chloride in mouse micronucleus test system. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.19, p.108–113, 2006.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**. V.29, nº4, p.755-760, 2006.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de alimentos.** São Paulo: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004. 184p.

ROCHA-GARCIA, C.E.; YOUSSEF, E.Y.; OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Antioxidantes utilizados na indústria cárnea: quais são os aditivos inibidores da

rancidez nos produtos cárneos. **Revista Nacional da Carne**, v.26, n.299, p.36-51, 2002.

ROCHA GARCIA, C.E.; YOUSSEF, E.Y.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M.; FIGUEIREDO, E.; SHIMOKOMAKI, M. Preservation of spent leghorn hen meat by a drying and salting process. **Journal of Applied Poultry Research**, v.12, p.335-340, 2003.

SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 567- 579, 2007.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SIEWE, F.B.; MBOUGUENG, P.D.; TATSADJIEU, L.N.; NOUMO, T.N.; CARL, M.F.M. The Potential Application of *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon citratus* Essential Oils as Natural Preservatives of Beef Patties. **Food and Nutrition Sciences**, v.6, p.374-385, 2015.

SOUZA, K.C.B. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3- O - methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.28, p.771–777, 2002.

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

TABARAKI, R.; HEIDARIZADI, E.; BENVIDI, A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punicagranatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. **Separation and *Purification Technology***, v.98, p.16-23, 2012.

TAKEMOTO, E.; TEIXEIRA, J. F.; GODOY, H. T. Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. **Química Nova**. 32, No 5, 1189-1194, 2009.

TAYEL, A.; EL-TRAS, W.; MOUSSA, S.; AND EL-SABBAGH, S. Surface Decontamination and Quality Enhancement in Meat Steaks Using Plant Extracts as Natural Biopreservatives. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.9, n.8, p.755-761, 2012.

TERMENTZI A, KEFALAS P, KOKKALOU E. Antioxidant activities of various extracts and fractions of Sorbus domestica fruits at different maturity stages**. Food Chemistry**, v.98, p.599–608, 2006.

TUTENEL, A. V.; PIERAD, D.; HOFF, J. V.; CORNELIS, M.; ZUTTER, L. Isolation and molecular characterization of Escherichia coli O157 isolated from cattle pigs and chickens at slaughter. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 63-69, 2003.

VALENTÃO, P. et al. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus L.*) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.17, p.4989- 93, 2002.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Spices as functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.51, n.1, p.13-28, 2011.

YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.M.; POKORNY, J. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.108, n.9, p.776-93, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de um estudo intitulado "Potencial antioxidante de extratos de marcela (*Achyrocline satureioides) e capim-limão (Cymbopogon citratus)* para aplicação em produto cárneo"**,** que tem como objetivo a extração de compostos bioativos da Marcela e Capim-limão métodos e posterior aplicação em Linguiça de Frango.

Procedimentos a serem realizados

Serão oferecidas a você amostras de linguiças e solicitado que você assinale utilizando a escala hedônica os atributos como: aparência global, cor, odor, sabor e textura. Após você responde a questão se compraria ou não o produto em questão.

Riscos possíveis e benéficos esperados

Fica claro que você não é obrigado a participar do projeto. No caso de recusa você não terá nenhum tipo de prejuízo. A qualquer momento da pesquisa você é livre para retirar-se da mesma. No caso de aceite, fica claro que os produtos oferecidos são seguros e de boa qualidade, não havendo prejuízos ou riscos à saúde, mas poderão ocorrer alguns desconfortos em relação ao sabor e odor na hora de provar. Não haverá benefício financeiro pela sua participação e nenhum custo para você. Você não terá benefícios diretos, entretanto, ajudará a comunidade científica na construção do conhecimento sobre as características sensoriais de um novo produto com maior prazo de validade.

Confidencialidade

Os dados obtidos com esta pesquisa serão publicados em revistas científicas reconhecidas. Os seus dados serão analisados em conjunto com os demais participantes, assim não aparecerão informações que possam lhe identificar, sendo mantido o sigilo de sua identidade. Após a pesquisa os dados serão destruídos.

Utilização dos dados obtidos

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo são o Prof. Dr. Nelcildo Nascimento Terra e Caroline Pagnossim Boeira, aluna do Programa de Pós-Graduação e Ciência e Tecnologias dos Alimentos da UFSM. Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos pesquisadores responsáveis pelo estudo para esclarecimento de eventuais dúvidas. Este estudo obteve aprovação junto ao Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, com o protocolo nº 67063317.1.0000.5346

Telefones para contato com a pesquisadora

- Caroline Pagnossim Boeira (55) 9966-2856

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades e prejuízos.

Ainda, declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito da pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

_____	_____
Assinatura do participante	Assinatura do responsável pelo estudo

Santa Maria,_____ de_____ de 2017.

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UFSM) – Avenida Roraima, 1000 – Prédio da Reitoria – 7º andar – Sala 702, Cidade Universitária, Bairro Camobi, 97105-900, Santa Maria – RS

APÊNDICE B

Ficha de avaliação Sensorial

Nome: _____Data: __/__/_ Sexo: ( ) F ( ) M
Idade: ( ) 17 – 30 ( ) 31 – 50 ( ) +51

Assinale os termos que descrevem as características apropriadas para cada amostra de linguiça avaliada:

Características	AMOSTRA **253**	AMOSTRA **368**	AMOSTRA **475**	AMOSTRA **520**	AMOSTRA **617**	AMOSTRA **728**
Gordurosa	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Cor escura	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Cor estranha	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Cor clara	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Cor uniforme	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Úmida	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Sabor de frango	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Sabor oxidado	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Sabor de ervas	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Tempero ideal	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Suculenta	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Salgada	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Sem sal	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Apimentado	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Consistente	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Macia	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Seca	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Borrachenta	( )	( )	( )	( )	( )	( )
Agradável	( )	( )	( )	( )	( )	( )

APÊNDICE C

Ficha de avaliação Sensorial

Nome: _____Data: __/__/_ Sexo: ( ) F ( ) M Idade: ( ) 17 – 30 ( ) 31 – 50 ( ) +51

Você está recebendo seis amostras de linguiça de frango, por favor, prove-as e assinale, através da escala, o quanto gostou ou desgostou dos seguintes atributos do produto:

ESCALA	AMOSTRA	ATRIBUTOS				
		COR	ODOR	SABOR	TEXTURA	APARÊNCIA
(9) GOSTEI MUITÍSSIMO						
(8) GOSTEI MUITO	_____	_____	_____	_____	_____	_____
(7) GOSTEI MODERADAMENTE	_____	_____	_____	_____	_____	_____
(6) GOSTEI LIGEIRAMENTE	_____	_____	_____	_____	_____	_____
(5) INDIFERENTE	_____	_____	_____	_____	_____	_____
(4) DESGOSTEI LIGEIRAMENTE	_____	_____	_____	_____	_____	_____
(3) DESGOSTEI MODERADAMENTE	_____	_____	_____	_____	_____	_____
(2) DESGOSTEI MUITO	_____	_____	_____	_____	_____	_____
(1) DESGOSTEI MUITÍSSIMO						

Em relação a sua intenção de compra você:

	AMOSTRA	
(5) Certamente compraria	_____	( )
(4) Provavelmente compraria	_____	( )
(3) Tenho dúvidas se compraria	_____	( )
(2) Provavelmente não compraria	_____	( )
(1) Certamente não compraria	_____	( )
	_____	( )
	_____	( )

1