

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

**EFEITO DA DIETA DE FRANGOS SUPLEMENTADA
COM FOLHAS DE OLIVEIRA (*OLEA EUROPAEA* L.)
NO DESENVOLVIMENTO ANIMAL E QUALIDADE
DA CARNE**

TESE DE DOUTORADO

Cristiane Marangoni

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**EFEITO DA DIETA DE FRANGOS SUPLEMENTADA COM
FOLHAS DE OLIVEIRA (*OLEA EUROPAEA* L.) NO
DESENVOLVIMENTO ANIMAL E QUALIDADE DA CARNE**

Cristiane Marangoni

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Qualidade dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Orientador: Prof. Alexandre José Cichoski

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Marangoni, Cristiane

EFEITO DA DIETA DE FRANGOS SUPLEMENTADA COM FOLHAS DE OLIVEIRA (OLEA EUROPAEA L.) NO DESENVOLVIMENTO ANIMAL E QUALIDADE DA CARNE / Cristiane Marangoni.-2015.

188 p.; 30cm

Orientador: Alexandre José Cichoski

Coorientador: Juliano Smanioto Barin

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2015

1. Frangos 2. Folhas de Oliveira 3. Qualidade I. Cichoski, Alexandre José II. Barin, Juliano Smanioto III. Título.

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**EFEITO DA DIETA DE FRANGOS SUPLEMENTADA COM FOLHAS
DE OLIVEIRA (*OLEA EUROPAEA* L.) NO DESENVOLVIMENTO
ANIMAL E QUALIDADE DA CARNE**

elaborada por
Cristiane Marangoni

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Alexandre José Cichoski, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Juliano Smanioto Barin, Dr. (UFSM)
(Co-orientador)

Neusa Fernandes de Moura, Dr^a. (FURG)
(Examinador)

Rodrigo Schwert, Dr. (Aurora Alimentos)
(Examinador)

Cristiano Ragagnin de Menezes, Dr. (UFSM)
(Examinador)

Paulo Cezar Bastianello Campgnol, Dr. (UFSM)
(Examinador)

Rodricler Cerezoli Bortoluzzi, Dr^a. (ADM)
(Suplente)

Roger Wagner, Dr. (UFSM)
(Suplente)

Santa Maria, 27 de novembro de 2015.

DEDICATÓRIA

Á **Deus**, pelo dom da vida, presença incontestável e demonstração de amor gratuito e infinito.

Aos meus pais **Felicino e Lourdes**, que me conduziram a uma formação pautada pela humildade, respeito, princípios morais e honestidade. Exemplo de seres humanos vencedores, perseverantes e de muita fé, muito obrigado por serem meus pais e tenham certeza de que esta etapa que se conclui seria impossível sem a participação de vocês.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento especial ao **Prof. Dr. Alexandre José Cichoski**, pelo exemplo de dedicação e orientação simples e clara e pelo convívio sereno e equilibrado. Obrigada pelo incentivo e ajuda nos momentos difíceis da elaboração deste trabalho e pelas orientações. Que Deus ilumine seus caminhos, pois “sem sacrifício não há vitória”.

Ao **Prof. Cristiano Ragagnin Menezes**, Coordenador do programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela experiência e habilidade na maneira de agir diante dos problemas e, principalmente, na dedicação e perseverança dedicados a melhoria do Programa de Pós Graduação. Meus sinceros agradecimentos, pois sem vossa ajuda não teria sido possível a realização desta defesa de Doutorado.

Aos professores doutores, **Nelcindo Nascimento Terra, José Laerte Nörnberg, Luisa Helena Rychecki Hecktheuer, Tatiana Emanuelli** e **Phd. Leadir Lucy Martins Fries** e **Carlos Eugenio Daudt**, a minha eterna gratidão aos ensinamentos transmitidos.

À **Profª. Sandra Macedo**, pela contribuição na área farmacêutica e auxílio na condução dos experimentos. Meus agradecimentos pela forma com que conduziu os trabalhos e compartilhou os resultados. Desejo-lhe muito sucesso em sua carreira.

À **Profª. Alice Teresa Valduga** da URI - Universidade Regional Integrada, pelo auxílio na liofilização da carne de frango.

A amiga, incentivadora e perseverante **Profª. Drª Neusa Fernandes de Moura**. Tenho um orgulho imenso de fazer parte do seu convívio profissional e pessoal.

À amiga **Rosa Cristina Prestes**, pela generosa contribuição na elaboração deste trabalho, pela sugestão de revistas e indicação de tradutores. Pelas orientações e consolo durante os momentos difíceis.

Ao **Prof. Roger Wagner**, pelos seus conselhos e incentivo ao envio de artigos.

Aos colegas do grupo de pesquisa, **Caroline Cavalheiro, Leonardo Senna, Heloisa Cristina de Moura, Cristine Rampelotto, Raquel Vendrusculo, Suelen Lima da Silva e Eloi Paulus** pelo convívio harmonioso, em que o companheirismo foi soberano a qualquer diferença nesta caminhada. Meus sinceros agradecimentos, pois sem a colaboração de vocês a conclusão desta pesquisa não seria possível.

A EPAGRI Chapecó, em especial ao Eng. Ftal. **Dorli Mario Da Croce M.Sc.** em Engenharia Agrícola, e ao gerente do Cepaf **Nelson Cortina, M.Sc** em administração, que cederam as folhas de oliveira para condução deste experimento, e aos demais funcionários que auxiliaram na coleta e secagem das folhas de oliveira.

Ao SENAI Chapecó, em especial a **Ana Paula Extekotter, Fabiana Casarin, Andréia Faion, Deila Lucia Soccol, Izabel dos Santos, Elis Regina Favero, Elisa Sonza, Jucirlei dos Santos Arcego e Ingrid Boesche Tomazelli**, que auxiliaram na condução dos experimentos microbiológicos e físico químicos.

A UNOCHAPECÓ Chapecó, em especial **Raquel Ternus** pelo auxílio nas análises de MIC e fenólicos totais realizadas nas folhas de oliveira.

Aos colegas de pesquisa **Cristiano Augusto Ballus** e **Helena Teixeira Godoy** do Departamento de Ciência de Alimentos da UNICAMP Campinas, SP, pelo auxílio na análise de HPLC das folhas de oliveira.

A FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processos 12/12565-0 e 13/25242-7).

A Cooperativa Central Aurora Alimentos que colaborou gentilmente cedendo espaço para criação dos frangos para condução do experimento e, em especial, ao responsável pelo

Departamento de Nutrição Animal **Rodrigo Toledo** e supervisor da granja experimental **Cesar Schaefer** pela atenção e tempo dispensados para a realização deste trabalho. Fica aqui o meu respeito e admiração pela capacidade, empenho e dedicação profissional de vocês.

Aos Gerentes de P&D **Rodrigo Schwert** e **Rodicler Bortoluzzi** pela possibilidade de realização do trabalho na Cooperativa Central Aurora Alimentos.

Ao Frigorífico Abatedouro de Aves de Quilombo, em especial ao gerente **Vanderlei de Ré** e supervisor do controle de qualidade **Mauricio Radaelli Moraes** pela inestimável colaboração na condução do abate dos animais, coleta e armazenamento de amostras.

Aos funcionários do Departamento de Pós-graduação: **Lia Cidade** e **Carlos Bianchin**, meu muito obrigado pela paciência, dedicação e disposição manifestadas. Tenham certeza de que o curso sem vocês não aconteceria.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DA DIETA DE FRANGOS SUPLEMENTADA COM FOLHAS DE OLIVEIRA (*OLEA EUROPAEA* L.) NO DESENVOLVIMENTO ANIMAL E QUALIDADE DA CARNE

AUTORA: Cristiane Marangoni

ORIENTADOR: Alexandre José Cichoski

Data e local da defesa: Santa Maria, 27 de novembro de 2015.

Frangos da linhagem Cobb receberam ração suplementada com folhas de oliveira (FO) da variedade ascolano nas quantidades de 5 e 10g/kg de ração durante os 42 dias de crescimento e foi realizada avaliação do desempenho animal indicando menores taxas de mortalidade e melhor conversão alimentar para os animais tratados com FO em relação aos que receberam dieta convencional. Os frangos adultos foram abatidos em frigorífico e as coxas e sobrecoxas foram armazenadas sob-refrigeração (4°C – por 12 dias) e congelamento (-18°C – por 120 dias) em embalagens de polietileno seladas sem extração de vácuo, para monitoramento microbiológico, oxidativo, físico químico e sensorial através da Análise descritiva Quantitativa (ADQ) e Intenção de compra (IC). As FO não demonstraram efeito sobre os parâmetros de proteína, gordura, cinzas, cor e oxidação protéica da carne, mas influenciaram os valores dos parâmetros de umidade, pH, a_w , exudação de líquido pela carne e de alguns aminoácidos em relação ao controle. A quantidade de 5g/kg de FO mostrou efeito na redução de dienos conjugados, TBARs, índice de peróxidos, e tiveram efeito na redução de crescimento de *Staphylococcus aureus*, *psicrotróficos* e mesófilos aeróbios, enquanto que a utilização de 10g/kg de FO reduziu a quantidade de ácidos graxos mono-insaturados e saturados, aumentou a concentração de ácidos graxos poli-insaturados e inibiu o crescimento de *Enterococcus* spp., bactérias lácticas, coliformes termotolerantes, *Pseudomonas*, *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* em relação ao tratamento que recebeu dieta convencional. A análise sensorial de ADQ indicou que as coxas e sobrecoxas dos frangos que receberam FO tiveram menor percepção dos atributos sabor e odor de ranço e melhores características de textura em relação ao tratamento que recebeu dieta convencional. A análise de IC indicou preferência das coxas e sobrecoxas de frangos alimentados com FO, prevalecendo como critério de escolha à melhoria de sabor. A carne de coxa e sobrecoxa liofilizada foi usada na alimentação de ratos machos *wistar* durante 25 dias na proporção de 20% sobre a dieta convencional para avaliação do perfil bioquímico do sangue dos animais. Os ratos expostos à carne de frangos alimentados com FO não indicaram toxicidade clínica e hematológica em relação aos animais que receberam dieta convencional.

Palavras-chave: Frango. Folhas de Oliveira. Qualidade.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Graduate Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

EFFECT OF DIET OF CHICKEN SUPPLEMENTED WITH OLIVE LEAVES (*OLEA EUROPEA* L.) IN ANIMAL DEVELOPMENT AND QUALITY OF MEAT

AUTHOR: Cristiane Marangoni

ADVISOR: Alexandre José Cichoski

Date and Venue of Thesis Defense: Santa Maria, November 27th, 2015

Chickens Cobb received diet supplemented with olive leaves (FO) of the variety Ascolano in amounts of 5 to 10 g/kg diet during the 42 days of growth and was conducted evaluation of animal performance indicating lower mortality rates and better feed conversion animals treated with FO than those who received conventional diet. The adult chickens were slaughtered in a refrigerator and thighs and drumsticks, were stored under refrigeration (4 °C - for 12 days) and freezing (-18 °C - 120 days) sealed in polyethylene containers without vacuum extraction, for monitoring microbiological, oxidative, chemical physical and sensory through descriptive Quantitative Analysis (QDA) and purchase intent (CI). The FO showed no effect on the protein parameters, fat, ash, color and protein oxidation of the flesh, but influenced the values of humidity parameters, pH, aw, liquid exudation by meat and some amino acids compared to control. The amount of 5g/kg FO showed lowering effect of conjugated dienes, TBARs, peroxide value, and had no effect on growth reduction of *Staphylococcus aureus*, *psychrotrophic* and mesophilic aerobes, while the use of 10g/kg FO reduced amount of monounsaturated and saturated fatty acids increased the concentration of polyunsaturated fatty acids and inhibited the growth of *Enterococcus* spp., lactic acid bacteria, coliforms, *Pseudomonas*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* in relation to the treatment which received standard diet. Sensory analysis indicated that the ADQ thighs and drumsticks of chickens that received FO had lower perceptions of taste and odor of rancid attributes and best texture characteristics regarding the treatment that received conventional diet. The IC analysis indicated preference thighs and drumsticks chickens fed FO, prevailing as a criterion of choice for improving taste. The meat of the thigh and drumstick lyophilized was used in feeding *Wistar* male rats for 25 days at the rate of 20% over conventional diet to evaluate the biochemical profile of animal blood. Rats exposed to broilers fed FO did not indicate clinical and hematological toxicity for animals who received conventional diet.

Key words: Chicken. Olive leaves. Quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Velocidade de crescimento de micro-organismos em função da atividade de água.....	27
Figura 2 - Alterações de cor.	28
Figura 3 - Principais consequências da oxidação de proteínas.....	31
Figura 4 - Molécula de Oleuropeína	38
Figura 5 - Curva de calibração de ácido gálico em mg/L	44
Figura 6 - A) Folhas de oliveira após colheita B) Folhas de Oliveira após secagem e moagem	105
Figura 7 - Perfil cromatográfico do extrato metanólico da amostra em pó das folhas de oliveira da variedade <i>Ascolano</i>	110
Figura 8 - Fotografia das coxas e sobrecoxas armazenadas resfriadas expostas à luz natural, obtida em resolução de 7,2 megapixels e qualidade de impressão 600 dpi.	122
Figura 9 - Número de colônias (\log_{10} UFC/g) de bactérias aeróbias mesófilas, bactérias ácido lácticas, Bactérias aeróbias psicotróficas e bacterias <i>pseudomonas</i> , em coxas e sobrecoxas de frangos armazenadas a 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 12 dias.	124
Figura 10 - Número de colônias (\log_{10} UFC/g) de Coliformes totais, Coliformes termotolerantes, <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp, <i>Clostridium perfringens</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em coxas e sobrecoxas de frangos armazenadas a 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 12 dias.	128
Figura 11 - Valores médios da análise de ADQ das coxas e sobrecoxas dos Tratamentos T1(Controle), T2(5g de oliveira) e T3(10g de oliveira) no 1° dia de armazenamento a 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)	132
Figura 12 - Valores médios da análise de ADQ das coxas e sobrecoxas dos Tratamentos T1(Controle), T2(5g de oliveira) e T3(10g de oliveira) no 12° dia de armazenamento a 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)	135
Figura 13 - Resultado do teste de Intensão de compra das coxas e sobrecoxas de frango	137
Figura 14 - Fotografia das coxas e sobrecoxas armazenadas congeladas expostas à luz natural, obtida em resolução de 7,2 megapixels e qualidade de impressão 600 dpi.	149
Figura 15 - Número de colônias (\log_{10} UFC/g) de bacterias aerobias mesofilas, bactérias ácido lácticas, Bacterias aeróbias psicotróficas e bacterias <i>pseudomonas</i> , em coxas e sobrecoxas de frangos armazenadas a -18°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 120 dias.	151
Figura 16 - Número de colônias (\log_{10} UFC/g) de Coliformes totais, Coliformes termotolerantes, <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp, <i>Clostridium perfringens</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em coxas e sobrecoxas de frangos armazenadas a -18°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 120 dias.....	154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tratamentos realizados com as respectivas quantidades de folhas suplementadas nas dietas.	46
Tabela 2 – Matrizes nutricionais referentes a cada uma das quatro fases de alimentação dos frangos.....	47
Tabela 3 – Grupo de Animais distribuídos para suplementação com carne de frango liofilizada.....	60
Tabela 4 – Perfil dos ácidos graxos livres das folhas de oliveira da variedade Ascolano após secagem e moagem.	107
Tabela 5 – Valores de CMI para extratos de folhas de oliveira (<i>Olea europaea</i> L.) frente a bactérias gram positivas e negativas.	108
Tabela 6 – Concentração de compostos fenólicos totais no extrato aquoso das folhas de oliveira (<i>Olea europaea</i> L.) obtidos de folhas secas e antes de secar..	109
Tabela 7 – Desempenho dos frangos pertencentes aos três tratamentos durante os 42 dias que receberam a ração.....	111
Tabela 8 – Valores de lipídeos, proteína, umidade, resíduo mial fixo, pH e aw nas coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a 4°C (±1°C) por 12 dias.....	115
Tabela 9 – Perfil de ácidos graxos livres nas coxas e sobrecoxas de frango no 1°, 7° e 12° dias de acompanhamento a 4°C (±1°C).	116
Tabela 10 – Valores de TBARs, índice de peróxidos, dienos conjugados, e proteínas carboniladas em coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a 4°C (±1°C) durante 12 dias.....	117
Tabela 11 - Valores médios de aminoácidos das coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a 4°C(±1°C) por 12 dias.....	120
Tabela 12 – Valores de CRA e exsudação em coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a 4°C (±1°C) por 12 dias.....	121
Tabela 13 - Valores médios de Cor (L*, a*, b*), das coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a 4°C(±1°C) por 12 dias.....	123
Tabela 14 –Lista consensual de termos descritivos obtidos pela avaliação dos degustadores.	131
Tabela 15 –Valores médios da análise de ADQ das coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a 4°C (±1°C).	133
Tabela 16 – Valores de lipídeos, proteína, umidade, resíduo mial fixo, pH e aw nas coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a -18°C (±1°C) por 120 dias.....	138
Tabela 17 - Perfil de ácidos graxos livres nas coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a -18°C (±1°C) por 120 dias.....	141
Tabela 18 – Valores de TBARs, índice de peróxidos, dienos conjugados, e proteínas carboniladas em coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a -18°C (±1°C) durante 120 dias.....	142
Tabela 19 – Valores de exsudação e CRA em coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a -18°C (±1°C) por 120 dias.....	145
Tabela 20 - Valores médios de Cor (L*, a*, b*), das coxas e sobrecoxas dos frangos armazenados a -18°C(±1°C) por 120 dias.....	147
Tabela 21 - Valores médios da análise de ADQ das coxas e sobrecoxas de frango com 30 e 60 dias de armazenamento congelado a -18°C(±1°C)	157

Tabela 22 - Valores médios da análise de ADQ das coxas e sobrecoxas dos Tratamentos T1(Controle), T2(5g de oliveira) e T3(10g de oliveira), com 90 e 120 dias de armazenamento congelado a $-18^{\circ}\text{C}(\pm 1^{\circ}\text{C})$	158
Tabela 23 – Ração realizada para os quatro tratamentos de ratos <i>Wistar</i>	161
Tabela 24 – Valores médios do consumo de ração e água suplementada aos ratos durante 25 dias.	162
Tabela 25 – Índices hematimétricos dos ratos dos diferentes tratamentos.	163
Tabela 26 – Perfil bioquímico do soro dos ratos dos diferentes tratamentos.....	166

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADQ	Análise descritiva quantitativa
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOCS	Sociedade Americana de Químicos em óleo do inglês <i>American Oil Chemists Society</i>
CAT	Catalase do inglês catalase
CCAC	Conselho canadense sobre cuidados de animais do inglês <i>Canadian council on animal</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CRA	Capacidade de Retensão de água
DAD	Detector de arranjo de diodos
DTAs	Doença transmitida por alimentos
EB	Extrato bruto
ERN	Espécies reativas ao nitrogênio
EROS	Espécies reativas ao oxigênio
FA	Ácidos graxos do inglês fatty acids
GSH	Glutathione do inglês glutathione
GSH Px	Glutathione peroxidase do inglês glutathione peroxidase
GSSG	Glutathione oxidada dissulfeto do inglês redutase de dissulfeto de glutathione
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência do inglês High performance liquid chromatography
ICMSF	Comissão Internacional de especificações microbiológicas para Alimentos do inglês International commission on microbiological specifications for foods
IN	Instrução Normativa
MAPA	Ministério da agricultura pecuária e abastecimento
MDA	Malonaldeído
pH	Potencial hidrogeniônico
PCA	Análise de Componentes Principais, do inglês <i>Principal Components Analysis</i>
PUFA	ácidos graxos poli-insaturados, do inglês <i>polyunsaturated fatty acids</i>
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RL	Radicais livres
SDP	Superoxido dismutase do inglês superoxide dismutase
TBARs	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
UFC	Unidade de formação de colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	CARNE DE FRANGO	18
2.2	COMPOSIÇÃO DA CARNE DE FRANGO.....	18
2.3	ALTERAÇÕES MICROBIOLÓGICAS NA CARNE DE FRANGO	20
2.4	ALTERAÇÕES OXIDATIVAS NA CARNE DE FRANGO	23
2.4.1	Oxidação lipídica	23
2.4.1.1	<i>Reação de oxidação lipídica</i>	24
2.4.2	Oxidação proteica	29
2.4.2.1	<i>Reação de oxidação proteica</i>	30
2.4.3	Oxidação biológica	32
2.5	ALTERAÇÕES SENSORIAIS NA CARNE DE FRANGO.....	33
2.6	REFRIGERAÇÃO E CONGELAMENTO DA CARNE DE FRANGO	34
2.7	OLIVEIRA (<i>OLEA EUROPAEA L.</i>).....	35
2.8	OBJETIVOS.....	40
2.8.1	Objetivo Geral	40
2.8.2	Objetivos Específicos	40
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1	OBTENÇÃO DAS FOLHAS DE OLIVEIRA (<i>OLEA EUROPAEA L.</i>)	41
3.2	CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS FOLHAS DE OLIVEIRA (<i>OLEA EUROPAEA L.</i>).....	42
3.3	CRIAÇÃO E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS FRANGOS	46
3.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS COXAS E SOBRECOCAS DE FRANGO.....	50
3.5	CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS COXAS E SOBRECOCAS DE FRANGO.....	53
3.6	CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL DAS COXAS E SOBRECOCAS DE FRANGO.....	56
3.6.1	Análise descritiva quantitativa	57
3.6.2	Intenção de compra	59
3.7	AVALIAÇÃO DO PERFIL SANGÜÍNEO DOS RATOS	59
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
4	ARTIGOS	62
4.1	EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE FOLHAS DE OLIVEIRA (<i>OLEA EUROPAEA L.</i>) NO DESENVOLVIMENTO E QUALIDADE DA CARNE DE FRANGOS	63
4.2	QUALITY OF MEAT FROM CHICKEN FED ON OLIVE LEAVES	81
5	DISCUSSÃO	105
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS FOLHAS DE OLIVEIRA (<i>OLEA EUROPAEA L.</i>)	105
5.2	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS ANIMAIS	111

5.3	AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS COXAS E SOBRECOXAS ARMAZENADAS RESFRIADAS	112
5.4	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS COXAS E SOBRECOXAS ARMAZENADAS RESFRIADAS	124
5.5	AVALIAÇÃO SENSORIAL DAS COXAS E SOBRECOXAS ARMAZENADAS RESFRIADAS	130
5.5.1	Análise descritiva quantitativa das coxas e sobrecoxas armazenadas resfriadas ...	131
5.5.2	Intensão de compra das coxas e sobrecoxas armazenadas resfriadas.....	136
5.6	AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS COXAS E SOBRECOXAS ARMAZENADAS ONGELADAS	137
5.7	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS COXAS E SOBRECOXAS ARMAZENADAS CONGELADAS	150
5.8	AVALIAÇÃO SENSORIAL DAS COXAS E SOBRECOXAS ARMAZENADAS CONGELADAS	156
5.9	AVALIAÇÃO DO PERFIL SANGUÍNEO DE RATOS	161
6	CONCLUSÕES.....	166
7	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	167
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	167

1 INTRODUÇÃO

Em 2011 a produção Brasileira de carne de frango atingiu 13,058 milhões de toneladas, garantindo ao Brasil posição entre os três maiores produtores mundiais, com Estados Unidos e China. O mercado interno permaneceu com 69% dessa produção e o restante foi exportado para mais de 150 países, o que tornou o Brasil o maior exportador mundial desde 2004 (UBABEF, 2012). O consumo per capita de frango no Brasil vem superando o consumo per capita de carne bovina desde 2005, configurando uma cadeia produtiva bem sucedida não só no mercado interno, como no cenário mundial. Isto faz com que este setor procure por constante aprimoramento tecnológico e manutenção da qualidade dos produtos finais.

A Organização Mundial da Saúde estima que as enfermidades causadas por alimentos constituam um dos problemas sanitários mais difundidos no mundo, sendo a segurança e a qualidade questões de grande preocupação em produtos avícolas, pois a carne de frango pode conter diversos micro-organismos patogênicos (MAROSO, 2008), e deteriorantes que são responsáveis por consideráveis perdas econômicas nas indústrias processadoras de carne e produtos derivados (GALLO NETTO, 2009). Portanto, oferecer um alimento seguro, do ponto de vista de saúde pública, no qual constituintes ou contaminantes que causem perigo à saúde estão ausentes ou em baixo limite de risco, é a meta da maioria das empresas da área de alimentos.

Além da questão microbiológica, os processos oxidativos que ocorrem em lipídios e proteínas constituem uma das principais causas de mudanças nos parâmetros de qualidade da carne, que ocorrem durante o processamento, distribuição, armazenamento e preparo final dos alimentos. A oxidação lipídica é muitas vezes responsável pela perda de qualidade via formação de sabor rançoso e é afetada pela duração e temperatura de armazenagem de carne (Tan Chen, 2005), bem como a presença de oxigênio, luz, pH entre outros parâmetros. Constitui um fenômeno espontâneo e inevitável, com implicação direta no valor comercial dos produtos que a partir deles são formulados. A oxidação dos ácidos graxos pode originar ainda hidroperóxidos, com deslocamento das duplas ligações e consequente formação de dienos conjugados (AOCS, 2004). Estas alterações resultam na destruição das vitaminas lipossolúveis, ácidos graxos essenciais, e ocasionam alterações indesejáveis de cor, sabor, e textura, tornando o alimento impróprio para o consumo (RAMALHO & JORGE, 2006). A

oxidação de proteínas produz modificações nos aminoácidos levando a formação de carbonilas e diminuindo o teor de sulfidril (XIONG, 2000), que alteram a capacidade de retenção de água e maciez da carne (ROWE et al., 2004), bem como seu valor nutricional (SANTÉ-LHOUELIER, 2008).

Na tentativa de controlar este processo, as indústrias alimentícias fazem uso de aditivos sintéticos com propriedades antioxidantes, que atuam preservando e estendendo a vida-útil de alimentos que contém lipídeos oxidáveis, através do retardo das reações de oxidação. Entretanto, aspectos toxicológicos dos antioxidantes têm sido uma das áreas de maior controvérsia nos debates sobre a segurança dos aditivos alimentares. Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo seu consumo, pesquisas têm sido dirigidas no sentido de encontrar compostos fenólicos que ocorrem naturalmente em plantas e estão presentes na dieta mediterrânea através de azeitonas e azeite de oliva como alternativas de compostos que possuem atividade antioxidante e antimicrobiana e promovem benefícios para a saúde (RYAN et al., 2002). O azeite de oliva e o fruto da oliveira já são conhecidos pelos seus benefícios, mas recentemente, as folhas da oliveira vêm ganhando destaque. Estudos recentes (BOTSOGLU et al., 2010, PACETTA, 2013) indicam que as folhas de oliveira apresentam benefícios para a carne de frango e suíno quando suplementadas via dietas.

As folhas da oliveira são ricas em vitaminas, fibras, sais minerais e ácidos graxos, incluindo o ômega 9 (PACETTA, 2007). Diversos autores realizaram caracterização dos compostos fenólicos presentes nas folhas de oliveira, os quais apresentam relação ao retardo da oxidação lipídica e oxidação da mioglobina (HAYES, et al., 2009; LEE et al., 2009). As propriedades benéficas das folhas de oliveira, seus possíveis efeitos antimicrobianos e antioxidantes, aliadas à necessidade de valorizar estes subprodutos agroindustriais conduziram a elaboração de novos projetos de investigação que visam averiguar o seu real valor e seu potencial uso industrial.

O presente trabalho tem como objetivo acompanhar as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de coxas e sobrecoxas de frangos que receberam em sua dieta quantidades diferentes de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.), e em outra etapa incluir a carne desses frangos na dieta de ratos e avaliar seu perfil bioquímico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARNE DE FRANGO

A avicultura vem destacando-se nas últimas décadas como um dos setores agrícolas que apresenta maior dinamismo dentre as atividades do agronegócio brasileiro. Seu crescimento é decorrente, sobretudo, dos avanços tecnológicos nas áreas de genética, nutrição, sanidade e manejo, os quais possibilitaram a instalação de uma indústria altamente eficiente e competitiva em todo mundo, particularmente no Brasil.

Com esse desempenho, a carne de frango está mais presente na mesa dos consumidores brasileiros e no mundo, constituindo importante alimento na dieta humana, não apenas como fonte de proteína de boa qualidade, mas também de minerais e vitaminas do complexo B, em especial niacina no músculo escuro e riboflavina no músculo claro (COUTINHO, 2007). Saudável, uma vez que apresenta pouca gordura, (maior percentual na pele e vísceras) e baixa taxa de colesterol, é recomendada para consumo em todas as idades, podendo ser consumida sem pele, por pessoas que tenham riscos cardiovasculares. A carne de frango é rica em aminoácidos indispensáveis (VENTURINI, SARCINELLI & SILVA; 2007), e devido ao seu alto valor nutritivo, tem merecido atenção no que se refere à conservação de suas propriedades funcionais, a fim de garantir um produto final de boa qualidade para os consumidores (UBABEF, 2012).

2.2 COMPOSIÇÃO DA CARNE DE FRANGO

A carne de frango é um produto perecível que contém quantidade de proteínas, carboidratos, lipídios, água, vitaminas e minerais, cuja conservação deve atender a padrões que preservem sua qualidade em todas as etapas de sua produção até o consumidor final.

Em geral as carnes são constituídas de 60 a 80% de água e 15 a 25% de proteína. O restante é composto principalmente por gorduras, sais minerais, pigmentos e vitaminas (SELANI, 2010).

Os lipídios têm papel determinante na aceitação da carne, pois sua concentração e composição tem influência nas propriedades organolépticas de textura, sabor, aroma e cor. O maior teor de lipídeos da carne está presente no músculo, variando de 1,5 a 13%, e consistindo de lipídeos de depósito e estruturais. Os lipídeos de depósito são fonte de energia celular, constituídos por ésteres de glicerol com ácidos graxos, predominando os triglicerídeos, podendo também conter pequenas quantidades de monoglicerídeos, diglicerídeos e ácidos graxos livres. Alguns lipídeos intramusculares estão acumulados em quantidades microscópicas no interior de células musculares, porém a maioria se localiza nos tecidos conectivos (COBOS et al., 1994), e variam de acordo com a espécie, raça, tipo de músculo, tecido, dieta e influências ambientais (VALSTA, TAPANAINEN, MANNISTO, 2005).

Os lipídeos das membranas celulares apresentam uma composição similar em todas as espécies animais, mesmo sob diferentes condições ambientais e de dieta (GERMAN, 1990). Os lipídeos polares contêm um teor maior de ácidos graxos poli-insaturados que os triglicerídeos (CAMBERO et al., 1991). Cobos et al. (1994) observaram que os ácidos graxos dos fosfolipídios do músculo esquelético são muito similares entre as espécies, tanto em ruminantes como em monogástricos. No entanto, constatou-se que é possível encontrar uma ampla variação na composição dos fosfolipídios celulares relacionados com o crescimento e a viabilidade das células (COBOS et al., 1994). Nas membranas celulares ainda há lipídeos estruturais, tais como fosfolipídios e o colesterol, essenciais para a função celular (ALLEN & FOEGEDING, 1981).

Os ácidos graxos diferem quanto ao comprimento da cadeia hidrocarbonada, número e tipo de ligações que unem os átomos de carbono, tornando-os de cadeia curta, média e longa, saturados e insaturados. Os principais ácidos graxos presentes na carne de frango são: palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e mirístico (C14:0). O ácido oléico (C18:1) é o monoinsaturado mais abundante, seguido do palmitoléico (C16:1). Os ácidos linoleico (C18:2), linolênico (C18:3) e araquidônico (C20:4) são os principais ácidos graxos poli-insaturados. Os ácidos graxos saturados e monoinsaturados são os constituintes mais importantes dos triglicerídeos da fração lipídica da carne. O perfil de ácidos graxos nos lipídeos de depósito pode variar em função da espécie do animal, raça, sexo, idade e alimentação, sendo que a carne de frango apresenta mais ácidos graxos poli-insaturados do que as carnes vermelhas (VALSTA, TAPANAINEN, MANNISTO, 2005).

O tipo de gordura da dieta animal constitui a maior fonte de variação na composição dos ácidos graxos dos lipídeos de depósito, principalmente em animais monogástricos. Asghar et al, (1990) verificaram que dietas de frangos adicionadas de diferentes tipos de gorduras como óleo de soja, oliva, linhaça, coco e manteiga de cacau afetaram a composição dos ácidos graxos na carne dos animais.

A alimentação com dietas adicionadas de gorduras com um alto teor de ácido linoleico, como óleo de soja, provocou o aumento da deposição deste ácido e do ácido araquidônico na gordura de suínos (MORGAN et al., 1992), coelhos (COBOS et al., 1994) e frangos (ASGHAR et al., 1990). O incremento em ácido araquidônico na carne se deve à síntese deste ácido a partir do ácido linoleico.

Os principais efeitos tecnológicos adversos associados à modificação da composição quantitativa de ácidos graxos dos lipídeos da carne são os originados da qualidade organoléptica, como aroma e sabor anômalos, devido a processos de oxidação desses ácidos poli-insaturados, além da redução da firmeza da carne, baixa suculência e pouca aceitabilidade.

2.3 ALTERAÇÕES MICROBIOLÓGICAS NA CARNE DE FRANGO

Entre os vários parâmetros que determinam a qualidade de um alimento, um dos mais importantes está relacionado às características microbiológicas. A avaliação da qualidade microbiológica de um produto fornece informações que permitem avaliá-lo quanto às condições higiênicas e sanitárias de processamento, armazenamento e distribuição para o consumo, sua vida útil e quanto ao risco à saúde da população.

Silva Jr. (2007), afirma que o estudo microbiológico tem por objetivos quantificar o grau de contaminação por micro-organismos deteriorantes, a presença de agentes patogênicos, o diagnóstico de agente causador de surtos de DTAs, como também auxiliar no monitoramento de medidas corretivas para melhorarem as condições higiênico-sanitárias de produção.

Quando se refere à micro-organismos presentes em carnes, praticamente fala-se de bactérias. A importância das bactérias em relação à carne reside principalmente no fato de que elas estão intimamente ligadas ao processo de deterioração, infecção e intoxicação alimentar.

Esta situação é favorecida em decorrência da carne apresentar uma composição rica em proteínas, glicídios, lipídios, vitaminas e sais minerais, elevado teor de umidade (de 65 a 74%) e um pH apropriado ao desenvolvimento microbiano (PARDI, et al., 2005). De acordo com Porto, (2006), o pH da carne de ave é propício ao desenvolvimento bacteriano por que apresenta-se mais elevado (5,8-6,4 pH) quando comparado a outras carnes, o que o torna desta forma, mais perecível.

A carga microbiana das carcaças de frango e seus derivados são representados por uma microbiota oriunda, principalmente, dos frangos vivos e, outra parte, incorporada em qualquer uma das etapas do abate ou do processamento. A microbiota do frango vivo se encontra essencialmente na superfície externa, espaço interdigital e tegumentos cutâneos, no trato digestivo e, em menor grau, no aparelho respiratório. O mecanismo de contaminação da carcaça de frangos, durante o processamento, envolve a retenção das bactérias numa camada líquida sobre a pele, para posterior adesão desta no músculo.

As bactérias presentes em uma carcaça ou em um corte cárneo atuam basicamente de duas formas: deteriorando ou agindo de forma patogênica. A principal ação é a de deterioração, pois sabe-se que uma conservação inadequada proporciona alteração dos produtos cárneos conservados em temperatura ambiente. Com relação aos agentes patogênicos, se não controlados nas indústrias de carnes podem causar tanto zoonoses, que estão em relativo controle, como principalmente toxinfecções alimentares (FORSYTHE, 2002).

A deterioração da carne é fortemente determinada pelo crescimento de bactérias na sua superfície, pois o tecido interno do músculo é considerado estéril até o momento do corte. pois o próprio animal possui em sua superfície grandes quantidades de bactérias que durante o processo de obtenção da carne (abate), irá contaminar inevitavelmente a superfície da carne (HOLLEY & GILL, 2005).

A temperatura de estocagem tem influência sobre o tipo de deterioração (FRANCO E LANDGRAF, 2008) e a frigorificação ou tratamento pelo frio artificial representa na atualidade a técnica mais utilizada para a conservação das carnes, controlando desta forma os micro-organismos deteriorantes. Sua ação impede a multiplicação bacteriana mantendo em padrões aceitáveis, no entanto, não reduzem sua população. Além disso, o frio auxilia consideravelmente na redução de toxinfecções e infecções, uma vez que grande parte das bactérias envolvidas em surtos de DTAs, não consegue crescer em temperaturas situadas em torno de 4°C (PARDI et al., 2005).

Frazier (1993), afirma que para ocorrer sinais evidentes da deterioração como mau cheiro (odores) ou pegajosidade nas carnes de frango, são necessários um número de micro-organismos na ordem de $2,5 \times 10^6$ a $1 \times 10^8/\text{cm}^2$ e de 1×10^7 a $6 \times 10^7/\text{cm}^2$, respectivamente.

A microbiota inicial da carne é muito variada e a maioria dos micro-organismos que alteram a carne fresca refrigerada são bactérias psicrófilas dos gêneros *Pseudomonas*, *Moraxella* e *Acinetobacter*, estando também presentes espécies anaeróbias facultativas como enterobactérias psicrófilas *Aeromonas* sp., *Shewanella putrefaciens* e micro-organismos gram-positivos como *Lactobacillus* sp. e *Brochorix thermosphaca*. Embora a contagem de micro-organismos aeróbios psicrófilos indique o grau de deterioração de alimentos refrigerados, a legislação brasileira não estabelece padrão para estes micro-organismos. Entretanto, a *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF, 1986), estabelece 6,0 a 7,0 \log_{10} UFC/g como padrão internacional para segurança alimentar. A contaminação de carcaças de frango tem importantes implicações para a segurança alimentar e influenciam na vida de prateleira da carne in natura (FREITAS et al., 2004). Diferentes micro-organismos têm sido isolados em carne de frango, como bactérias mesófilas produtoras de toxinfecções alimentares como *Salmonella* sp, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* sp., *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Streptococcus* sp., e *Bacillus* sp.

Os produtos cárneos são considerados de qualidade microbiológica aceitável quando atendem critérios determinados pela legislação vigente. A Portaria nº 451/97 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1997) estabelecia como norma para carne de frango a ausência de *Salmonella* em vinte e cinco gramas (25g) do produto. Tal Portaria foi revogada pela Resolução nº 12/01 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), que determina apenas a contagem de coliformes a 45°C, não considerando micro-organismos importantes como *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* (FREITAS et al., 2004). De acordo com a RDC nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012), que contém o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, é estabelecida a padronização dos valores para *Escherichia coli* de 3,0 a 4,0 \log_{10} UFC/g. Conforme as informações contidas na RDC nº 13/2001 (ANVISA, 2012), a presença de *Salmonella* spp. nos miúdos e carne das aves existe de forma crítica, o que é considerado um problema mundial, não havendo medidas efetivas para o controle da referida bactéria (BRASIL, 2001).

2.4 ALTERAÇÕES OXIDATIVAS NA CARNE DE FRANGO

Os processos oxidativos são os principais fatores não-microbiológicos envolvidos na deterioração da qualidade da carne durante seu armazenamento. A oxidação induz alterações dos lipídios e proteínas do músculo, afetando as propriedades organolépticas e nutricionais das carnes e produtos cárneos, devido a inúmeras reações em cadeia favorecidas pela luz e oxigênio. Isto é refletido em perdas econômicas e transtornos para a saúde (INSANI, et al., 2008).

2.4.1 Oxidação lipídica

A oxidação lipídica é uma das causas mais importantes de deterioração durante o armazenamento de carnes e produtos cárneos, depois da deterioração microbiana, principalmente por sua complexidade e variabilidade. Apesar dos lipídios serem importantes componentes dos produtos cárneos, conferindo características desejáveis de suculência, sabor e aromas, eles são facilmente oxidáveis. Este processo envolve a degradação de ácidos graxos e hidrocarbonetos, a degradação de vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos essenciais, além de afetar atributos sensoriais como o sabor, a cor, a textura e o valor nutricional (HERAS et al., 2003).

Os fenômenos oxidativos no músculo ocorrem imediatamente após o abate, quando o mecanismo celular que controla a oxidação lipídica é inativado, além da alteração de odor, gosto e cor, a oxidação lipídica está relacionada também com a produção de substâncias potencialmente tóxicas como malonaldeídos e óxidos de colesterol. O excesso de oxidação pode atingir um nível de rancidez onde o alimento não é aceito para o consumo humano, porém, mesmo antes desta condição ser atingida, a oxidação lipídica pode formar moléculas tóxicas com possíveis danos para a saúde humana (ZANARDI et al., 2004).

2.4.1.1 Reação de oxidação lipídica

O processo de peroxidação lipídica é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado, propagada por radicais peroxilas e resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído (LIMA, 2001).

A oxidação lipídica afeta os ácidos graxos, principalmente os poli-insaturados (FERNÁNDEZ, PÉREZ-ÁLVAREZ & FERNÁNDEZ-LOPEZ, 1997), gerando produtos que alteram a qualidade e as características organolépticas da carne, diminuindo a aceitação do produto por parte do consumidor. Estas reações diminuem o valor nutricional do alimento e podem até mesmo ser nocivos à saúde (GALLO NETTO, 2009), devido à ingestão contínua e prolongada dos produtos rancificados (BOBBIO & BOBBIO, 2001). A oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados pode originar hidroperóxidos, com deslocamento das duplas ligações e consequente formação de dienos conjugados (AOCS, 2004).

A carne de frango se caracteriza por possuir uma concentração relativamente elevada de ácidos graxos insaturados, que a torna mais susceptível à rancidez oxidativa em comparação a outros tipos de carne, sendo superada somente pela carne de peixe (BYRNE et al., 2002), principalmente durante os processos de trituração, onde o oxigênio é incorporado ao músculo, e cozimento, onde o ferro é liberado das heme-proteínas (CARRERAS, 2004).

As rotas de formação dos peróxidos, hidroperóxidos a compostos carbonilas (aldeídos e cetonas), podem ocorrer por processos denominados oxidação catalisada por enzimas, fotoxidação e autoxidação.

A via de formação dos hidroperóxidos catalisada por lipoxigenases está caracterizada como uma forma distinta de iniciação, que ocorre pela ação das enzimas lipoxigenases, que atuam sobre os ácidos graxos poli-insaturados, catalisando a adição do oxigênio à cadeia hidrocarbonada poliinsaturada. O resultado é a formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas, que podem envolver-se em diferentes reações degradativas (RAMALHO & JORGE, 2006).

O mecanismo de fotoxidação de gorduras insaturadas é promovido essencialmente pela radiação UV em presença de fotosensibilizadores (clorofila, mioglobina, riboflavina e outros), que absorvem o comprimento de onda na faixa do visível e a transferem para o oxigênio triplete (${}_{3}O^{2}$), gerando o estado singlete (${}_{1}O^{2}$), (BERGER & HAMILTON, 1995). O oxigênio singlete reage diretamente com as duplas ligações gerando peróxidos e

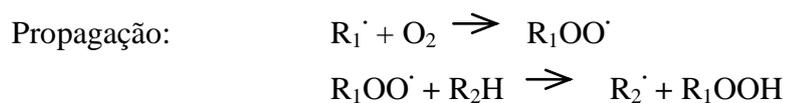
hidroperóxidos diferentes daqueles observados na ausência de luz e sensibilizadores, e que por degradação posterior originam aldeídos, cetonas e alcoóis (SILVA, BORGES & FERREIRA, 1999).

A autoxidação compreende o principal mecanismo de oxidação das gorduras. Há uma sequência clássica de reações inter-relacionadas para explicar o processo de autoxidação dos lipídeos, em que o oxigênio reage com os ácidos graxos insaturados e que ocorre em 3 etapas conforme descrito por JADHAV et al., (1996):

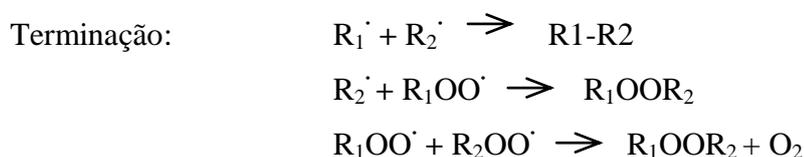
1. **Iniciação:** Ocorre a formação de radicais livres dos ácidos graxos insaturados devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo, em condições favorecidas por luz e calor.



2. **Propagação:** Nesta etapa os radicais livres reagem com oxigênio para formar os radicais peroxila, os quais reagem com a molécula do lipídio, formando hidroperóxidos, que ao se decomporem geram novos radicais livres. Os hidroperóxidos são chamados de produtos de primeira oxidação e podem ser utilizados como indicadores de qualidade e estabilidade de óleos. A velocidade de oxidação lipídica é limitada pela etapa de propagação (SPITELLER & SPITELLER, 1998).



3. **Terminação:** Nesta etapa ocorrem reações entre os próprios radicais, originando outros não radicais, como dímeros e polímeros, sendo que a reação de dois radicais requer baixa energia de ativação e tem como resultado da reação produtos estáveis (produtos secundários da oxidação) como aldeídos e cetonas (Berger & Hamilton, 1995).



Os hidroperóxidos formados durante o processo de oxidação lipídica são essencialmente inodoros, contudo, eles se decompõem em uma grande variedade de compostos secundários voláteis e não voláteis. Dentre estes, os aldeídos são os que mais contribuem para perda do aroma natural das carnes devido a sua alta velocidade de formação durante o processo de oxidação lipídica. De uma maneira geral, o odor desenvolvido nas carnes armazenadas sob refrigeração pode ser atribuído mais ao mascaramento do seu aroma natural resultante do aumento do conteúdo de odores desagradáveis no material armazenado, do que pela degradação do aroma original (GRAY, OWEN & ADAMS, 1996).

A oxidação também pode ser função da atividade de água do produto, propriedade de um alimento que pode ser definida como a água disponível para o crescimento microbiano ou demais reações de natureza química, física ou enzimática. Para os alimentos, em geral, com valores menores que 0,6 de atividade de água, a intensidade de deterioração é mais baixa, sendo cada vez menor à medida que este valor diminui (Figura 1). No entanto, a susceptibilidade de carnes congeladas à oxidação pode ser função da a_w . Enquanto que a carne fresca possui uma a_w de 0,99, durante o congelamento, os músculos mantidos sob temperaturas de -18°C , ela pode ser reduzida a valores de até 0,6. Como se pode visualizar através da Figura 2, a atividade de água na faixa de 0,8 a 0,6 favorece o aumento das reações de oxidação lipídica (VAN LAACK, 1994).

Os alimentos perecíveis são os que oferecem maior disponibilidade de água para o crescimento microbiano. A redução da atividade de água é, portanto, fator preponderante na preservação de alimentos (Figura 1). Em geral, afirma-se que ao se reduzir a atividade de água de 0,85 para 0,65, a vida útil aumenta de uma semana para dois anos, desde que o produto seja devidamente embalado, de modo a manter a atividade de água constante ao longo da armazenagem (BRAGA & PERES, 2010).

A atividade de água pode influenciar as reações químicas de diferentes maneiras. Pode também alterar a mobilidade dos reagentes e formar pontes de hidrogênio ou complexos com os reagentes. Dessa forma, um aspecto prático muito importante relacionado à atividade de água é controlar as reações químicas e enzimáticas indesejáveis, que reduzem a vida útil dos alimentos. A velocidade das alterações nas propriedades dos alimentos pode ser minimizada ou acelerada dependendo do valor da atividade de água (SARANTÓPOULOS, 2001).

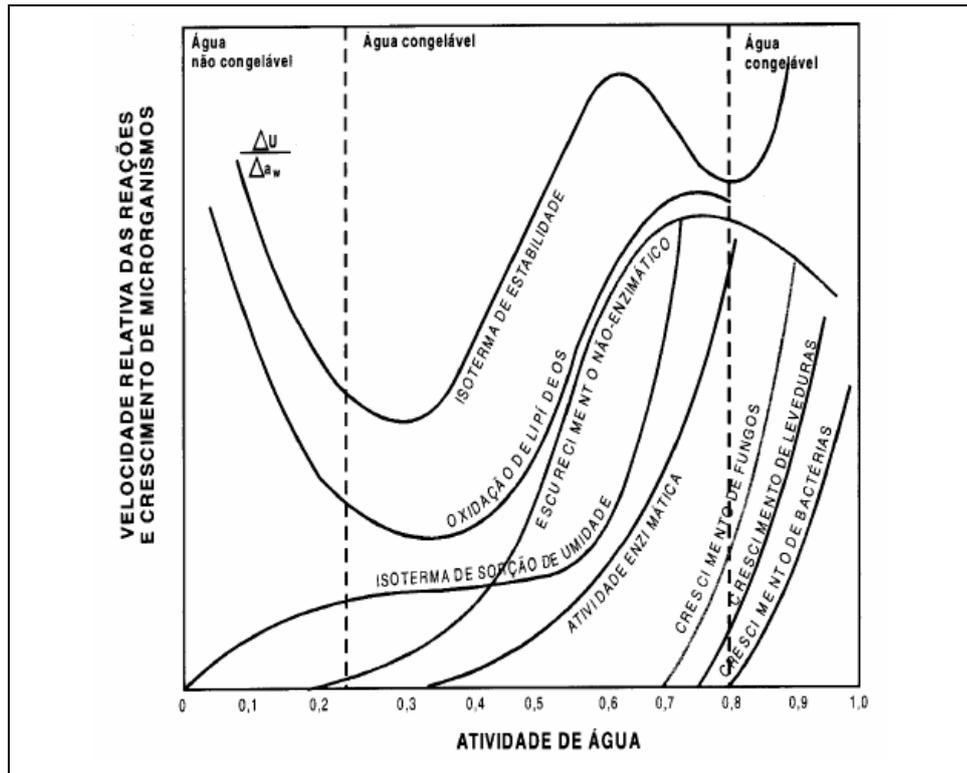


Figura 1 - Velocidade de crescimento de micro-organismos em função da atividade de água. Fonte: ROBERTSON (1992).

A cor pode ser utilizada para acompanhar a qualidade oxidativa de carnes frescas, tendo importante influência na decisão de compra pelos consumidores e na sua aceitação. Consiste em uma importante propriedade funcional e está intimamente relacionada ao pH, capacidade de retenção de água, capacidade de emulsificante e textura.

A alteração de cor na carne durante armazenamento congelado se deve à oxidação da oximioglobina (GENOT, 2000) de coloração vermelho-brilhante, à forma de metamioglobina (mioglobina oxidada), de coloração marrom, conforme demonstrado na Figura 2.

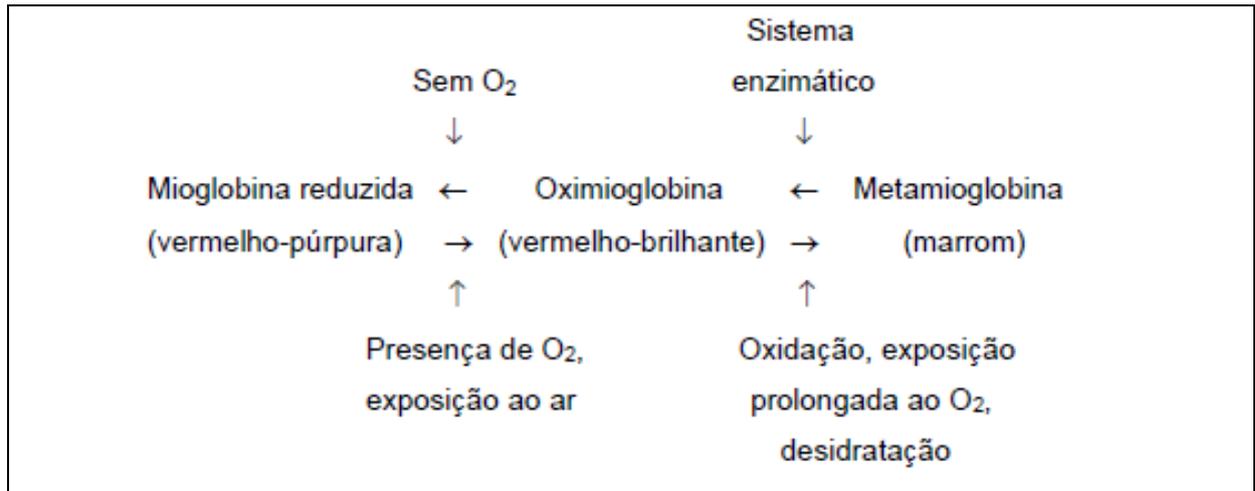


Figura 2 - Alterações de cor. Fonte: PAINE & PAINE, (1983).

A oxidação da oximioglobina na superfície da carne é um resultado de processos de degradação fotoquímica e térmica. Em carnes congeladas, a fotooxidação destes pigmentos pode ser um grande problema para a aceitação do produto (GENOT, 2000).

Carnes com valores de pH menores que 5,7, logo após o abate, podem ser classificadas como carnes PSE (pale, soft e exudative), fenômeno que se caracteriza pela desnaturação das proteínas. A desnaturação aumenta a birrefringência da carne, causando o desvio da luz, isto é, menos luz é transmitida através das fibras e mais luz acaba sendo dispersa, levando à palidez da carne.

Para evitar a autooxidação de gorduras, há a necessidade de suprimir todos os fatores que a promovem, mantendo mínimo os níveis de energia (temperatura e luz), que são responsáveis pelo processo de desencadeamento de formação de radicais livres, evitando a presença de traços metálicos na gordura, reduzindo ao máximo o contato com o oxigênio e bloqueando o processo de formação de radicais livres através da adição de antioxidantes, os quais, quando adicionados em pequenas quantidades, atuam interferindo no processo de oxidação dos lipídeos (RAMALHO & JORGE, 2006).

2.4.2 Oxidação proteica

A oxidação proteica pode ocorrer no músculo post-mortem durante seu armazenamento, acarretando a deterioração da qualidade da carne (ROWE et al., 2004). A depleção dos antioxidantes endógenos faz com que o músculo post-mortem fique mais susceptível à oxidação (XIONG et al., 2007).

Diferentes processos metabólicos ocorrem no tecido muscular, dando origem à formação de espécies reativas ao oxigênio (EROs), incluindo os radicais hidroxila e peroxila, ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. Quando as proteínas são alvos de EROs, o resultado dessa interação é a formação de grupos carbonilas e o decréscimo de grupos tiólicos de proteínas (componente sulfidril) e a oxidação do tripeptídeo glutathiona (GSH) à glutathiona dissulfeto (GSSG), indicando um estado de estresse oxidativo apresentando alterações nas propriedades das proteínas da carne (XIONG et al., 2007).

A oxidação das proteínas ocasiona a modificação de uma proteína induzida de forma direta por espécies reativas ou indiretamente através da reação com produtos secundários do estresse oxidativo. Embora as proteínas também sejam substratos para a ação dos radicais livres, seu efeito sobre elas é menos intenso do que se verifica nos lipídios, devido ao fato das reações serem mais lentas. Alguns dos agentes responsáveis pela oxidação protéica são o peróxido de hidrogênio, metais de transição como ferro e cobre, luz ultravioleta, ozônio e produtos da oxidação lipídica (SHACTER, 2000).

A oxidação proteica sofre processos similares àqueles da oxidação lipídica, envolvendo três fases: iniciação, propagação e terminação. Devido ao dano oxidativo, as proteínas podem sofrer modificações em aminoácidos específicos, mudanças conformacionais, fragmentação da cadeia peptídica ou alteração da carga elétrica. Estas alterações podem provocar diversas consequências funcionais, tais como aumento da susceptibilidade à proteólise e inativação enzimática (SHACTER, 2000).

Estes processos estão normalmente ligados a uma diminuição na funcionalidade da proteína do músculo, levando às perdas crescentes de água, géis de proteína mais fracos ou emulsões menos estáveis. Além disso, essas modificações podem afetar negativamente a qualidade sensorial da carne com relação à cor, textura, suculência e maciez alterando as propriedades das proteínas da carne fresca e influenciando na qualidade de produtos cárneos (LUND, et al., 2007).

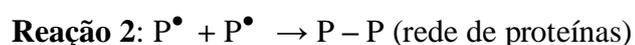
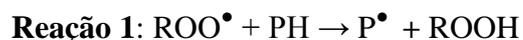
De acordo com Pino (2005), a carne de frango pode sofrer desnaturação proteica durante seu armazenamento, a qual pode ocorrer devido a oscilações na temperatura, e como consequência, as proteínas perdem capacidade de reter água, alterando a textura da carne após descongelamento, bem como suas propriedades funcionais.

2.4.2.1 Reação de oxidação proteica

O mecanismo da oxidação proteica é descrito como uma reação em cadeia de radicais livres semelhante à oxidação lipídica, no entanto, uma maior complexidade das vias e uma maior variedade de produtos de oxidação foram relatados na oxidação de proteínas (LUND et al., 2011).

A oxidação de proteínas e aminoácidos é afetada por fatores ambientais como pH, temperatura, atividade de água e presença de catalisadores ou inibidores, além da estrutura de cada proteína. Os aminoácidos mais susceptíveis à oxidação são os grupos amino e fenólicos. Devido a sua estrutura, os aminoácidos triptofano, histidina, prolina, lisina, cisteína, metionina e tirosina são propensos à oxidação, onde o átomo de hidrogênio é captado a partir de grupos contendo OH, S, ou N. Decorrente da oxidação, a metionina é transformada em sulfona metionina, o triptofano em kynuresina e a tirosina em ditirosina. A clivagem oxidativa da cadeia principal peptídica e da oxidação das cadeias laterais de lisina, arginina, prolina e treonina tem sido mostradas por produzir derivados de carbonilas (FILGUERAS, 2010).

Produtos primários (hidroperóxidos) e secundários (aldeídos e cetonas) da oxidação lipídica podem reagir com proteínas e causar oxidação proteica. A oxidação de proteínas ocorre através de reações de radicais livres na qual os radicais peroxila (ROO^\bullet) formados durante a oxidação lipídica podem captar átomos de hidrogênio de moléculas proteicas (PH) (Reação 1). Consequentemente, radicais de proteínas são formados (P^\bullet) e podem formar uma rede de proteínas (PP), devido à ligações cruzadas (Reação 2):



Além disso, o processo de oxidação proteica pode ocorrer devido à formação de complexo não-covalente por atrações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas entre hidroperóxido lipídico (ROOH) ou produtos secundários da oxidação lipídica e nitrogênio ou enxofre de resíduos reativos de aminoácidos da proteína (PH) (Reação 3).



Sabe-se, no entanto, que a reação de radicais com proteínas e peptídeos na presença de oxigênio dá origem a alterações na cadeia principal e lateral dos aminoácidos. Estas alterações oxidativas incluem clivagem de ligações peptídicas, modificação de cadeias laterais de aminoácidos e formação de ligações cruzadas de proteínas (LUND, 2011), conforme apresentado na Figura 3.

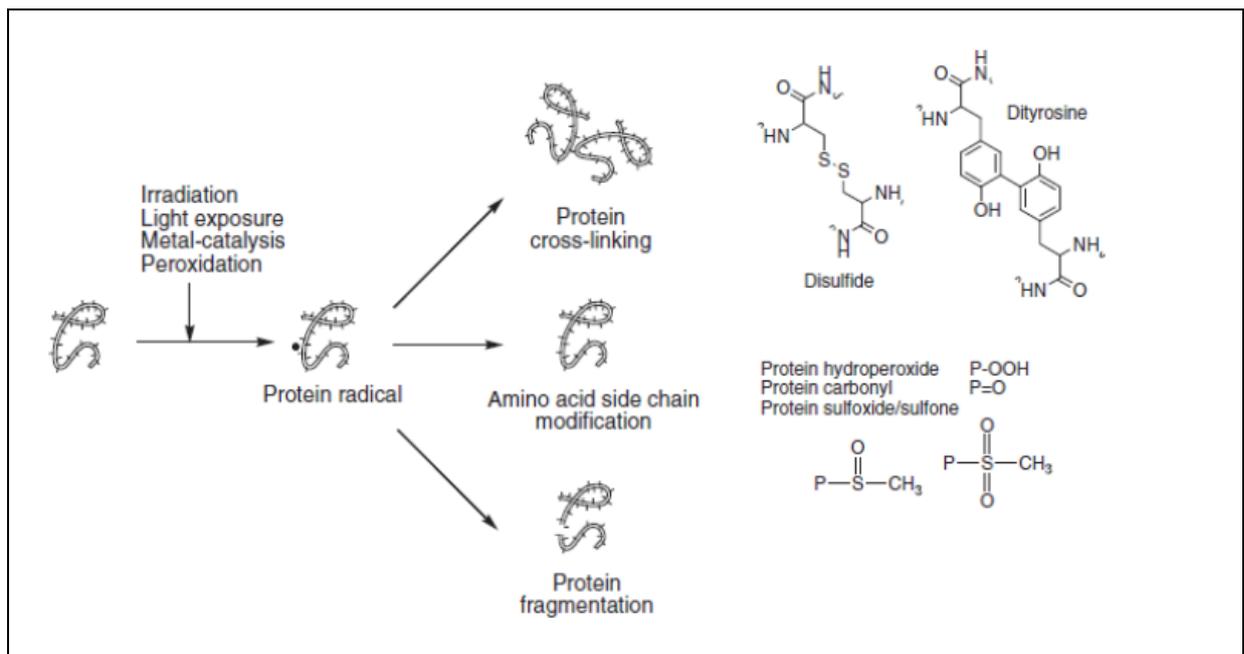


Figura 3 - Principais consequências da oxidação de proteínas. Fonte: LUND, (2011).

As principais modificações em aminoácidos são a formação de grupos carbonílicos de proteínas e hidroperóxidos, enquanto que ligações cruzadas têm sido descritas como a formação de dissulfeto e dityrosine através da perda de cisteína e resíduos de tirosina (ESTÉVEZ; OLLILAINEN; HEINONEN, 2009).

2.4.3 Oxidação biológica

Efeitos tóxicos do oxigênio sobre componentes biológicos já eram conhecidos no final do século XIX, tornando-se objeto de intensa investigação científica nos últimos anos. Estes efeitos são resultantes da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídeos, principalmente ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), mediada por espécies reativas ao oxigênio (ERO) e espécies reativas ao nitrogênio (ERN), conhecidas genericamente como radicais livres (RL) (GILLER & SIGLER, 1995; ROMERO *et al.*, 1998). A reação destas espécies com os AGPI, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular.

O processo de oxidação *in vivo* inicia uma reação em cadeia que danifica lipídios, proteínas e DNA (SHACTER, 2000). O dano ao DNA está associado a mutações, erros de translação e inibição da síntese de proteínas, enquanto os danos às proteínas alteram o transporte de íons ou a atividade de enzimas.

A peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados altera a composição, estrutura e propriedades da membrana (fluidez, permeabilidade, entre outras), além das atividades de enzimas a ela relacionadas (SURAI & DVORSKA, 2002). Como resultado destes danos às moléculas biológicas, pode haver comprometimento de muitos sistemas e processos orgânicos, afetando inclusive o ganho de peso, desenvolvimento, imuno competência e reprodução.

Para prevenir ou retardar as reações oxidativas, o tecido muscular conta com diversos sistemas antioxidantes endógenos, entre eles as enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (CHAN & DECKER, 1994).

A concentração e atividade de muitos destes antioxidantes endógenos pode ser influenciada pela dieta, e desta forma pode-se aumentar a estabilidade oxidativa da carne sem que a adição de antioxidantes seja necessária (MARASCHIELLO, SARRAGA & GARCIA-REGUEIRO, 1999). Pesquisas têm estabelecido que a composição das carcaças de frangos pode ser alterada pelo tipo e pela quantidade de ácidos graxos da dieta. O tipo de ácidos graxos fornecidos, dependendo do grau de saturação nas dietas afeta seu uso metabólico e o

acúmulo de gordura nos frangos (TOGASHI et al., 2007), sendo que os ácidos graxos poli-insaturados produzem menor deposição de gordura em comparação aos saturados e aos monoinsaturados (CRESPO & ESTEVE-GARCIA, 2001). Já o consumo de dietas suplementadas com ácidos graxos insaturados possibilita a deposição desses ácidos nos tecidos (TOGASHI et al., 2007).

Há interesse em alimentos que contenham altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) devido aos efeitos benéficos sobre a saúde humana, principalmente na prevenção de doença cardiovascular motivando diversas pesquisas sobre o enriquecimento de carne de frango com PUFA por adição de gorduras poli-insaturadas para a dieta AJUYAH et al, 1993, LÓPEZ-FERRER et al, 1999). No entanto, a carne de frango enriquecida com PUFA contém maior quantidade de ácidos graxos (FA) com um elevado número de ligações duplas, o que pode aumentar a susceptibilidade à oxidação (TOGASHI et al., 2007).

2.5 ALTERAÇÕES SENSORIAIS NA CARNE DE FRANGO

A cor da carne é o mais importante atributo de qualidade que influencia na aceitabilidade de produtos cárneos pelo consumidor (MANCINI & HUNT, 2005). A oxidação lipídica promove a modificação da cor de carnes pela transformação do pigmento oximioglobina, de coloração vermelho brilhante, em metamioglobina, tornando a carne marrom-acinzentada (KRANNER, 1994). A oxidação do pigmento pode catalisar a oxidação lipídica, assim como os radicais livres produzidos durante esse processo podem oxidar o átomo de ferro ou desnaturar a molécula de mioglobina, alterando a cor do produto cárneo (JAKOBSEN & BERTELSEN, 2000).

A degradação do sabor desejável das carnes é favorecido pela autooxidação de lipídeos. O lipídio do músculo, em particular os seus compostos fosfolipídios sofrem degradação para produzir um grande número de compostos voláteis. Enquanto os hidroperóxidos, produtos primários da oxidação lipídica, são inodoros e insípidos, a sua degradação leva a formação de produtos secundários voláteis e não voláteis. Destes compostos aldeídos, hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres entre outros, são os principais responsáveis pela perda de sabor desejável em carnes de frango (CAMPO et al., 2006). Os sabores oxidados são prontamente detectáveis depois de 48 horas, em contraste com o ranço que se desenvolve

mais lentamente e fica evidente somente depois de prolongado armazenamento sob congelamento (SELANI, 2010).

A maciez é considerada de grande importância para a aceitabilidade da carne, sendo definida pela facilidade que a carne tem de ser mastigada ou cortada. A maciez tende a ser maior em animais jovens e diminui com a idade, devido ao acúmulo e, principalmente, à maturação do tecido conectivo nas fibras musculares (GOMIDE, RAMOS & FONTES, 2009). É afetada pelo desenvolvimento do *rigor mortis*, atividade proteolítica que ocorre na carne, genética, sexo, maturidade e velocidade de resfriamento da carcaça (KOBELITZ, 2011).

2.6 REFRIGERAÇÃO E CONGELAMENTO DA CARNE DE FRANGO

O frio conserva o alimento pela inibição total ou parcial dos principais agentes causadores de alterações microbiológicas, enzimáticas e metabólicas dos tecidos animais após sacrifício. A aplicação do frio pode ocorrer pelo resfriamento ou congelamento do produto (ORDÓNEZ, 2005).

Uma das formas do uso do frio na conservação de alimentos é a refrigeração, nesse processo o alimento tem sua temperatura reduzida para valores entre -1 a 8°C. Desse modo, é possível reduzir a velocidade das transformações microbiológicas e bioquímicas nos alimentos, prolongando assim a sua vida útil por dias ou semanas (FELLOWS, 2006).

Em temperaturas de refrigeração ocorre apenas diminuição da velocidade de multiplicação dos microorganismos. Quanto mais baixas as temperaturas empregues na conservação, mais lentas as reações químicas, a atividade enzimática e o crescimento microbiano (SOUZA et al., 2013).

O congelamento compreende outra forma de conservação através de baixas temperaturas, onde parte da água sofre mudança em seu estado, formando cristais de gelo. Como consequência a *aw* é reduzida, o que proporciona aumento da vida útil do produto. O congelamento retarda mas não para as reações físico-químicas e bioquímicas que levam a deterioração, que durante armazenamento congelado leva a uma mudança lenta e progressiva na qualidade sensorial (RAHMAN & RUIZ, 2007).

A microflora do produto não é completamente destruída pelo congelamento, mas o número de células viáveis é reduzido durante o processo e armazenagem imediatamente após

o congelamento, a eficiência da eliminação de micro-organismos varia de acordo com a espécie, sendo que as células que continuam viáveis logo após o congelamento vão, gradualmente, tornando-se inviáveis durante o armazenamento (SARANTÓPOULOS et al., 2001).

Nas condições usuais de congelamento (-18°C) a atividade microbiana é praticamente impedida, tendo em vista que a maioria dos microorganismos não se desenvolve em temperaturas inferiores a -10°C. De modo geral, os produtos cárneos congelados possuem, como parâmetro de qualidade, o grau de desnaturação proteica que ocorre devido às condições do congelamento e descongelamento e oscilações na temperatura de armazenamento. A desnaturação de proteínas ocorre devido às condições do congelamento e descongelamento e oscilação na temperatura de armazenamento. Com a desnaturação, as proteínas perdem a capacidade de reter água, o que irá alterar a textura da carne após o descongelamento e suas propriedades funcionais (ARDITO, 1994).

Além da desnaturação de proteínas, podem ocorrer nos produtos cárneos congelados, desidratação da superfície, oxidação de gordura e alterações na cor (SARANTÓPOULOS et al., 2001). A desidratação superficial ou queima pelo frio prejudica o aspecto da carne, ressecando sua superfície, comprometendo sua coloração, sabor e textura, além de acarretar perda de peso (SOUZA et al., 2013). A deterioração do sabor devido à oxidação das gorduras é um fator limitante da vida útil de carnes e produtos cárneos congelados. As carnes de suínos e aves rancificam mais rapidamente que a carne bovina, uma vez que apresentam maior porcentagem de gorduras, além de serem mais insaturadas. A cor da carne congelada é influenciada pelo processamento, material de embalagem, velocidade de congelamento e condições de armazenamento como a temperatura, tempo e luz. Flutuações de temperatura também podem comprometer a cor da superfície de aves rapidamente congeladas (SARANTÓPOULOS et al., 2001).

2.7 OLIVEIRA (*OLEA EUROPAEA* L.)

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma planta frutífera da família botânica *Oleaceae*, sendo a única da espécie que origina frutos comestíveis. Foram catalogadas aproximadamente 35 espécies do gênero *Olea*. Estão incluídas na espécie *Olea europea* L. todas as oliveiras

cultivadas e também as silvestres (ARTAJO et al, 2006). No Brasil, a olivicultura iniciou no ano de 1940, alavancou-se a partir de 2000, e atualmente diversas cultivares como Arbequina, Arbosana, Koroneiki, Grapola e Ascolana são encontradas no estado de Santa Catarina (COUTINHO, RIBEIRO & CAPPELLARO, 2009). Em franco crescimento, a indústria da oliveira e do azeite gera entre 5 e 10% de subprodutos, incluindo águas-ruças, massa de azeitona e as folhas. De modo a reduzir custos e aumentar a sustentabilidade da atividade do setor olivícola, estes subprodutos devem ser valorizados. Por um lado, uma utilização comum das folhas da oliveira é o seu uso como alimento para animais (ALTIOK et al., 2008; AHMAD-QASEM et al., 2013), por outro lado, devido a sua composição, da qual se destaca a presença em oleuropeína e hidroxitirosol (MICOL et al., 2005), as folhas de oliveira têm despertado interesse para uso como fonte de compostos bioativos.

As folhas de oliveira tem sido usadas na medicina tradicional com intuito de prevenir diabetes (KOMAKI et al., 2003) estando aliadas ao combate de dores de cabeça, arteriosclerose e hipertensão devido ao fato de possuírem propriedades antissépticas, hipoglicêmicas e diuréticas (MEIRINHOS ET AL., 2005; SATO ET AL., 2007; HALOUI ET AL., 2010), onde o primeiro estudo conhecido sobre o pó das folhas de oliveira foi realizado por Lee-Huang et al., (2003) para o tratamento da febre e malária.

Ensaio experimentais em animais de laboratório e ensaios clínicos efetuados revelaram efeitos hipoglicêmicos e hipotensores atribuídos as folhas de oliveira (SOMOVA ET AL., 2003; EL & KARAKAYA, 2009) e outros estudos revelaram a capacidade dos seus extratos diminuírem a pressão arterial em animais e aumentarem o fluxo sanguíneo nas artérias coronárias, diminuindo a incidência das arritmias e prevenindo espasmos musculares intestinais (BENAVENTE-GARCIA ET AL., 2000; SINGH ET AL., 2008). Outras pesquisas demonstram que as folhas de oliveira possuem atividades biológicas destacando-se a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana ou antiviral com capacidade de inibir a infecção e transmissão entre células do HIV-1 (KOMAKI ET AL., 2003; LEE-HUANG ET AL., 2003; KONTOGIANNI & GEROTHANASSIS, 2012; BOCK ET AL., 2013). Estas propriedades medicinais associadas às folhas de oliveira têm sido atribuídas à sua composição rica em compostos fenólicos. As folhas possuem uma maior capacidade antioxidante e poder bloqueador de radicais (EL & KARAKAYA, 2009) e é nas folhas que existe maior quantidade de compostos fenólicos (BOCK et al., 2013), quando comparado as demais partes da planta.

Os compostos fenólicos são substâncias produzidas no metabolismo fenilpropanoide, pela via chiquimato (RYAN et al., 2002) e sua composição nas folhas de oliveira pode variar de acordo com o cultivar (Meirinhos et al., 2005), método de extração (PEREIRA et al., 2007) e época de colheita (BRAHMI et al., 2013), sendo armazenados quase que exclusivamente sob a forma conjugada, o que segundo Ryan et al., 2002 está intimamente relacionado a baixa toxicidade de alguns compostos favorecendo a solubilidade e o depósito em certos compartimentos celulares bem como o transporte de compostos às células, inclusive intracelular. Os compostos fenólicos acumulam-se essencialmente nos frutos e nas folhas, especialmente durante a fase de crescimento e na primeira fase de maturação. As folhas contêm fenóis simples, como o hidroxitiosol, o tirosol, o ácido vanílico, ácido p-cumárico, o ácido caféico, e outros fenóis mais complexos, os secoiridóides, como a oleuropeína e oligostrósido (RANALLI et al., 2006).

O principal secoiridóide encontrado nas folhas de oliveira é a oleuropeína (Figura 4). É também o que representa a estrutura química de maior tamanho e é também o mais abundante, podendo atingir 14% da matéria seca das folhas, sendo um fenol complexo, de sabor amargo (RANALLI et al., 2006). Segundo Ranalli et al. (2006), a alta concentração de oleuropeína nas folhas se deve às condições de armazenamento. Quando a folha é seca em baixas temperaturas, o conteúdo de oleuropeína aumenta, devido ao desaparecimento quase que total dos outros polifenóis por oxidação.

LEE et al., (2009) avaliaram a composição das folhas de oliveira através da extração por diferentes solventes e após colheita das folhas, as mesmas foram lavadas com água destilada, e submetidas a secagem a 40°C (± 5) durante 6 horas sendo identificado como o principal composto em todos os solventes utilizados a oleuropeína. A oleuropeína é um secoiridóide que resulta do metabolismo secundário dos monoterpenos, e está presente apenas nas plantas da família *Oleaceae*, constituindo o composto mais abundante na folha de oliveira (SOLER-RIVAS et al., 2000) e podendo alcançar concentrações de 60-90 mg/g por matéria seca de folhas (EL & KARAKAYA, 2009).

Bisignano et al., (1999) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* da oleuropeína e do hidroxitiosol extraídos de folhas de oliveira, e identificaram eficiência frente à bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*. Em outro estudo Bisignano et al., (2001) identificaram componentes antimicrobianos das folhas da oliveira, e constataram a eficácia dos aldeídos alifáticos de cadeia longa frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas.

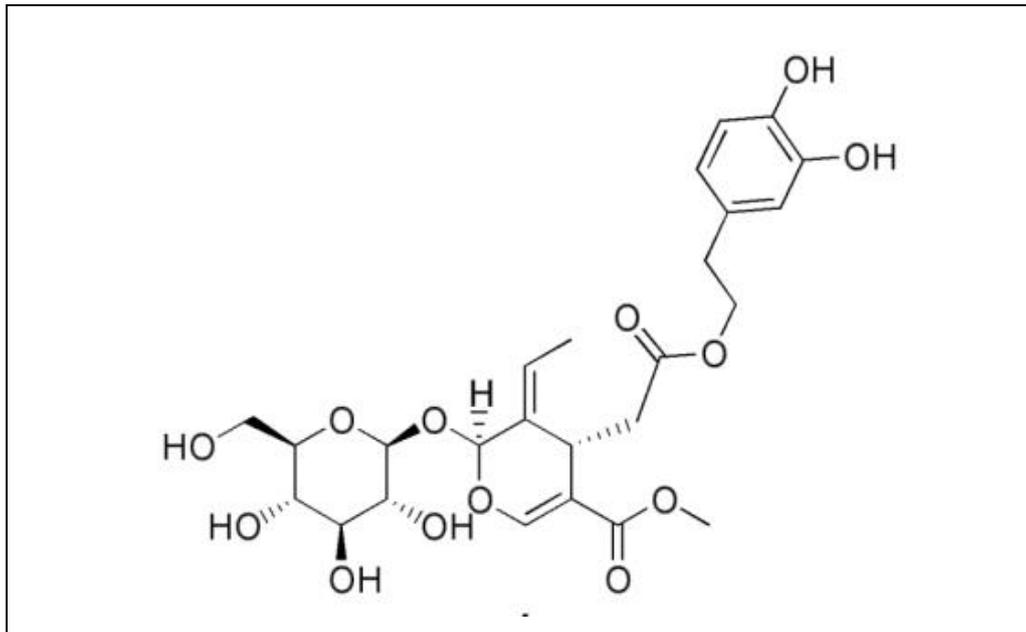


Figura 4 – Molécula de oleuropeína. Fonte: RANALLI et al, (2006).

Ao investigar a atividade *in vitro* de um extrato comercial de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) que continha 4.4 mg/mL de oleuropeína, frente a uma vasta gama de microorganismos, Sudjana et al., (2009) constataram que o composto apresentou atividade inibitória para *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, e *Staphylococcus aureus*. A atividade *in vitro* de folhas de oliveira também foi estudada por Markin, Duek & Berdicevsky, (2003) que observaram eficiência especialmente frente à *Klebsiela* e *Pseudomonas*.

Foi avaliado o efeito do uso de folhas de oliveira como suplemento na dieta de perus nas quantidades de 5 e 10g de folhas/kg de ração, em relação a qualidade microbiológica dos filés de peito que foram armazenados a 4°C por 12 dias. Os filés de peito de perus que receberam folhas de oliveiras na dieta apresentaram menor número de colônias de bactérias ácido lácticas, psicotróficas, mesófilas e enterobactérias (BOTSOGLOU et al, 2010). Neste mesmo estudo Botsoglou et al, (2010) concluíram que o ganho de peso corporal médio não diferiu significativamente ($P>0,05$) entre os grupos que receberam e não receberam folhas de oliveira na dieta. O autor menciona que este resultado indica que a incorporação de folhas de oliveira, para as dietas não tiveram qualquer influência adversa sobre a taxa de crescimento dos perus. A oxidação lipídica avaliada através de TBARs pelos mesmos autores indicou retardo significativo ($P<0,05$) nos tratamentos que receberam folhas de oliveira via dieta em

relação ao tratamento controle. Os autores indicaram que o retardo da oxidação lipídica foi resultado da atividade antioxidante de vários componentes que entraram no sistema circulatório, e foram distribuídos e retidos nos tecidos dos perus. Aliado ao uso bioativo das folhas de oliveira ao interesse considerável da indústria alimentar, na procura de antioxidantes e antimicrobianos naturais, com propriedades funcionais, capazes de manter ou melhorar a qualidade dos gêneros alimentícios (SIGER et al., 2012), as folhas podem ser vistas como uma fonte de compostos de interesse para a indústria agroalimentar.

2.8 OBJETIVOS

2.8.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de folhas de oliveira da variedade Ascolano no desenvolvimento de frangos e sobre a qualidade da carne de coxas e sobrecoxas após suplementação via dieta em diferentes percentuais.

2.8.2 Objetivos Específicos

- 1 Caracterizar as folhas de oliveira da variedade Ascolano.
- 2 Avaliar o desempenho dos frangos que tiveram folhas de oliveira suplementada na dieta em comparação à um controle que recebeu alimentação convencional.
- 3 Acompanhar a qualidade da carne através da evolução de microorganismos deteriorantes e patógenos, evolução da oxidação lipídica e proteica, e das características físico químicas e sensoriais das coxas e sobrecoxas, durante armazenamento resfriado a 4 °C (12 dias) e congelado a -18°C (120 dias).
- 4 Estudar o efeito das coxas e sobrecoxas dos frangos alimentados com folhas de oliveiras no perfil bioquímico de ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em sete etapas:

- 1 Determinou-se a composição centesimal, MIC, compostos fenólicos totais e quantificação do teor de oleuropeína presente nas folhas de oliveira da variedade Ascolano;
- 2 Foram criados 2.520 frangos, os quais receberam dietas suplementadas com diferentes percentuais de folhas de oliveira;
- 3 Realizou-se acompanhamento do desempenho dos frangos durante o crescimento;
- 4 Avaliou-se as características físico-químicas da carne das coxas e sobrecoxas armazenadas a 4°C (12 dias) e a -18°C (4 meses);
- 5 Avaliou-se as características microbiológicas da carne de coxas e sobrecoxas armazenadas a 4°C (12 dias) e a -18°C (4 meses);
- 6 Foram avaliadas as características sensoriais da carne de coxas e sobrecoxas armazenadas a 4°C (12 dias) e a -18°C (4 meses);
- 7 Avaliou-se o perfil sanguíneo de ratos alimentados com as coxas e sobrecoxas de frangos que receberam dietas suplementadas com folhas de oliveira em diferentes percentuais.

3.1 OBTENÇÃO DAS FOLHAS DE OLIVEIRA (*OLEA EUROPAEA* L.)

O processo de coleta, secagem e moagem das folhas de Oliveira (*Olea europaea* L.) foi realizado em parceria com a Epagri/Cepaf/Chapecó na Unidade Experimental do Projeto Oliveiras/SC.

A variedade Ascolano foi utilizada neste estudo, devido à pesquisa realizada por Cavalheiro, (2013) indicar concentração elevada de ácidos graxos benéficos para a saúde e concentrações elevadas de diversos minerais quando comparada a outras quatro variedades de oliveira.

Foi realizada coleta de 142 kg de folhas de Oliveira (*Olea europaea* L.) da variedade Ascolana entre os meses de janeiro a março de 2012 de um cultivar de Oliveiras com cinco anos de idade. Após coleta do material, foi realizada limpeza e classificação das folhas para remoção de possíveis contaminantes físicos. O material selecionado foi seco em estufa, utilizando temperatura de 45°C e circulação de ar durante o tempo de 72 horas. As folhas de oliveira secas foram moídas em moinho de navalhas do tipo Willey com peneiras de 1 mm armazenadas em embalagens primárias de papel, secundárias de polietileno e acondicionadas em geladeira entre 4 e 8°C até utilização.

3.2 CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS FOLHAS DE OLIVEIRA (*OLEA EUROPAEA* L.)

A caracterização das folhas de oliveira da variedade Ascolano foi realizada em parceria com o Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI-Chapecó).

Proteína, Umidade, Lipídios, Resíduo mineral fixo

As análises de determinação de proteína, umidade, lipídeos e resíduo mineral fixo das folhas de oliveira da variedade Ascolano foram realizadas em triplicata conforme metodologia descrita na IN 20, de 21/07/1999 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 1999).

Concentração Inibitória Mínima – MIC

Os micro-organismos utilizados para realização da pesquisa foram: *Escherichia coli* (ATCC8739), *Salmonella typhimurim* (ATCC14028), *Shigella dysenteriae* (NCTC7919), *Yersinia enterocolitica* (CDC175), *Clostridium perfringens* (NCTC8798), *Listeria monocytogenes* (ATCC19117), *Staphylococcus aureus* (ATCC29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC14502), *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048) adquiridos liofilizados da coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz em São Paulo.

Preparação dos inóculos bacterianos

As bactérias liofilizadas foram ativadas em tubo contendo 0,5ml de caldo nutritivo e inoculadas a 35°C por 48h. Alíquotas de cada cultura ativada foram replicadas em 3 tubos contendo 15 ml de Ágar nutritivo e incubadas a 35°C por 24h. Transferiu-se uma alíquota de cada cultura bacteriana para tubos contendo 5ml de solução salina a 0,8% de NaCl. A turvação da suspensão foi padronizada de acordo com a escala nefelométrica de MacFarland em 0,5 que corresponde à concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (Unidades Formadoras de Colônias por mililitros).

Avaliação da atividade antibacteriana

A análise de Concentração Inibitória Mínima foi realizada para duas amostras de folhas de oliveira: a primeira das folhas in natura (antes da secagem) e a segunda das folhas após secagem em estufa. Foi preparado extrato vegetal através de maceração das folhas de oliveira com etanol a 70% durante sete dias. Após a filtração, os extratos foram concentrados em evaporador rotatório a vácuo e o produto final foi armazenado em frasco de vidro sob refrigeração (4 a 8°C). A avaliação da atividade antibacteriana através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato bruto (EB) obtido das folhas de oliveira foram realizadas por microdiluição nas concentrações 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 e 0,156 mg/ml. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 horas e lidas com auxílio de revelador.

Compostos fenólicos totais

A determinação dos fenólicos totais seguiu a metodologia descrita por Swain & Hills (1959). Utilizou-se como padrão o ácido gálico marca Sigma, nas concentrações de 50, 100, 150, 200 e 250 mg/L para construir uma curva de calibração apresentada na Figura 5. A partir da equação da reta obtida na curva do gráfico do padrão ácido gálico, realizou-se o cálculo do teor de fenólicos totais, expresso em mg de ácido gálico/L de amostra seca.

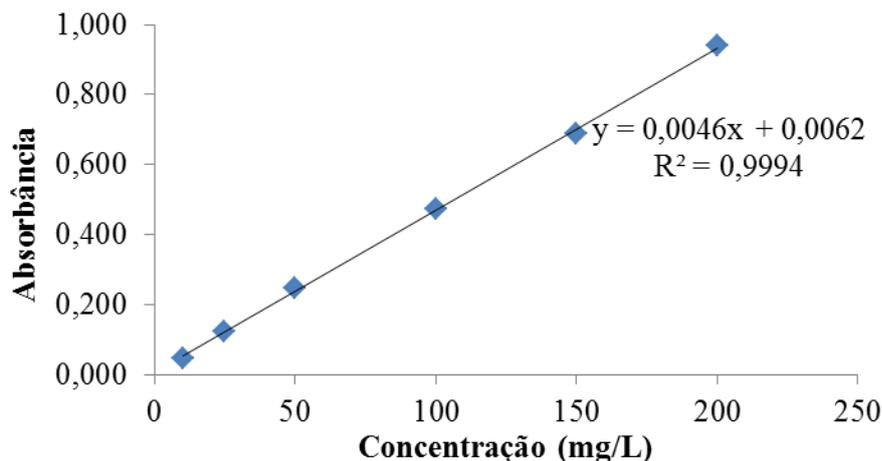


Figura 5: Curva de calibração de ácido gálico em mg/L.

Teor de oleuropeína das folhas de oliveira

A identificação dos compostos presentes nas folhas de oliveira após secagem e moagem foi realizada através de cromatografia líquida HPLC conforme descrito a seguir.

Reagentes e padrões

Foram utilizados metanol grau HPLC (Merck, Alemanha) e ácido acético p.a. (Synth, Brasil). O padrão de oleuropeína foi adquirido da Extrasynthese (França). A água foi purificada em um sistema Milli-Q (Millipore, EUA). Uma solução estoque de oleuropeína na concentração de 5 g.L⁻¹ foi preparada em metanol grau HPLC. Esta solução estoque foi filtrada em membrana PVDF de 0,22 µm (Millipore, EUA) e utilizada para o preparo das soluções de trabalho, sendo estocada a -18°C e protegida da exposição à luz.

Preparo do extrato metanólico para determinação do teor de oleuropeína

A oleuropeína presente no pó preparado a partir das folhas de oliveira foi extraída utilizando-se extração sólido-líquido, a partir do método inicialmente proposto por Guimarães et al. (2013). Em um erlenmeyer, pesou-se aproximadamente 1 g de amostra do pó de folhas de oliveira e, em seguida, 25 mL de metanol foram adicionados. Esta mistura foi agitada durante uma hora e posteriormente filtrada em papel filtro. O resíduo sólido foi submetido a uma nova extração com 25 mL de metanol sob agitação durante uma hora, com posterior filtração em papel filtro. Os extratos metanólicos foram combinados e evaporados em

evaporador rotatório (39°C) até *secura*. O resíduo foi resuspenso em 3 mL de metanol e filtrado em membranas de PVDF de 0,22 µm (Millipore, EUA). Todo o processo de extração da oleuropeína foi repetido 3 vezes ($n = 3$).

Separação, identificação e quantificação da oleuropeína por HPLC-DAD

A separação da oleuropeína foi realizada utilizando-se um sistema de cromatografia líquida HPLC Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Alemanha) acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD), com sistema de bomba quaternária, injetor automático e forno para o controle de temperatura da coluna. Foi utilizada uma coluna de fase reversa (C₁₈) com dimensões de 100 mm de comprimento X 4,6 mm de diâmetro interno x 3,0 µm de tamanho de partícula (ACE 3 C18, Advanced Chromatography Technologies Ltda, Escócia). As condições cromatográficas foram inicialmente baseadas em Quirantes-Piné et al. (2013) e posteriormente adaptadas para o extrato do pó de folhas de oliveira. Foi empregada eluição por gradiente, a 25°C, com vazão de 0,8 mL.min⁻¹. A fase móvel consistiu em água com 0,5% de ácido acético (A) e metanol (B). O gradiente consistiu nos seguintes passos: 0 min, 5% de B; 5 min, 15% de B; 15 min, 40% de B; 25 min, 50% de B; 35 min, 60% de B; 40 min, 80% de B; 50 min, 95% de B; 55 min, 5% de B. As condições iniciais foram mantidas por 5 min. O volume de injeção foi de 20 µL. A detecção foi realizada a 280 nm. A identificação do pico de oleuropeína foi obtida por comparação do tempo de retenção e do espectro UV do pico da amostra com os mesmos parâmetros apresentados pelo pico obtido para o padrão de oleuropeína, nas mesmas condições cromatográficas, bem como por cromatografia. Os extratos foram injetados em triplicata. Para a injeção dos padrões e dos extratos foi necessário prepará-los em metanol:água (50:50, v/v). A quantificação da oleuropeína foi realizada por calibração externa. A faixa de linearidade obtida para o padrão de oleuropeína foi de 75 a 200 mg.L⁻¹. A curva analítica foi construída com seis pontos igualmente espaçados, cada qual preparado em triplicata e injetados aleatoriamente. A equação resultante, ($y = 5,012x - 106,95$), apresentou r^2 de 0,9914.

3.3 CRIAÇÃO E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS FRANGOS

A ração dos frangos foi elaborada nos meses de agosto e setembro de 2012, na Fábrica de Ração da Cooperativa Central Aurora Alimentos localizada em Xanxerê, Santa Catarina. A criação dos frangos foi realizada em Granja Experimental da Cooperativa Central Aurora Alimentos situada no município de Chapecó, Santa Catarina no período de setembro a outubro de 2012.

Descrição dos tratamentos

Foram elaboradas três formulações de ração, as quais receberam diferentes quantidades de folhas de oliveiras, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos realizados com as respectivas quantidades de folhas de oliveiras suplementadas nas dietas.

Tratamento	Abreviação	Diferença
Controle	T1	Sem adição de oliveira
Tratamento 1	T2	5g de folhas de oliveira/kg de ração
Tratamento 2	T3	10g de folhas de oliveira /kg de ração

A ração experimental foi fornecida em quatro fases (Tabela 2): pré-inicial (PI: 1 a 12 dias), inicial (I: 13 a 21 dias), crescimento (C: 22 a 32 dias) e final (F: 33 a 42 dias). Em cada uma das quatro fases da alimentação foi realizada adição de folhas de oliveira.

Tabela 2. Matrizes nutricionais referentes a cada uma das quatro fases de alimentação dos frangos.

	PI	I	C	F
Milho	558,000	636,000	662,667	690,667
Farelo de soja	315,342	238,977	189,403	155,675
Farinha de vísceras de aves	68,000	58,000	56,000	49,333
Farinha de penas	-	10,000	25,333	34,667
Óleo de soja	28,000	-	40,000	-
Gordura de aves	0,000	30,000	-	45,333
Calcário calcítico	7,500	7,000	6,667	6,333
Sal granulado iodado	4,400	4,600	4,267	4,133
L-Lisina HCL 50%	6,700	6,800	7,667	7,733
Metionina MHA	4,600	3,600	3,400	2,867
Cloreto colina 75%	0,450	0,400	0,400	0,367
Aditivo antimicotoxinas	2,000	-	-	-
L-Treonina	2,078	1,793	1,767	1,572
Rovabio Excel AP xilase + B-glucanase	0,050	0,050	0,050	0,050
Ronozyme ProAct - protease	0,200	0,200	0,200	0,200
Ettoxiquine	0,150	0,150	0,150	0,150
Ronozyme HiPhos (M) fitase	0,020	0,020	0,020	0,020
Lincomicina 44%	0,010	0,010	0,010	-
Anticoxilidiano	0,500	0,500	0,500	-
Premix *	2,000	1,900	1,500	0,900

Nota 1: Rações elaboradas para as quatro fases de alimentação dos frangos: pré-inicial (PI), inicial (I), crescimento (C) e final (F).

*Premix: Composto por vitamina A (4.275 KUI), vitamina D₃ (1.395 KUI), vitamina E (22.500 mg), vitamina K₃ (1.350 mg), vitamina B₁ (1.350 mg), vitamina B₂ (3.600 mg), vitamina B₆ (1.800 mg), vitamina B₁₂ (9.900 µg), ácido pantotênico (9.000 mg), niacina (18.000 mg), ácido fólico (900 mg), biotina (76.500 µg), cobre (7.200 mg), ferro (27.000 mg), manganês (27.000 mg), iodo (450 mg), zinco (45.000 mg) e selênio (180 mg).

Unidade experimental

A unidade experimental foi composta por dois galpões de 20 m de comprimento x 7 m de largura. Cada galpão, possui 18 boxes medindo 3m de comprimento x 2m de largura com capacidade para alojar até 70 frangos por box. Esta metragem possibilitou uma área de 0,086 m²/frango.

Foram utilizados neste experimento, 2.520 frangos de corte, fêmeas, linhagem Cobb, vacinados contra as doenças de Marek e Bronquite infecciosa, alojadas com um (1) dia de idade pesando em média 46g. Os frangos foram criados de acordo com as recomendações de manejo descritas por Gomes, Albino & Silva (1996), com programa de luz contínuo (natural+artificial) durante todo o período experimental. Foram realizadas as análises físico-químicas e microbiológicas da água de consumo dos animais, antes de iniciar o experimento, pelo Laboratório Mercolab, credenciado junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para diagnóstico de Salmoneloses e Micoplasmoses aviárias, sob portaria n° 14 de 27 de janeiro de 2009, que utilizou como metodologia de referência o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Smeww, 1998).

Os frangos foram distribuídos ao acaso em 36 boxes em condições semelhantes às de um aviário normal (ambiente, manejo, bem estar), contendo campânula a gás, comedouro tubular e bebedouro pendular, ração e água à vontade; resultando em 70 aves/box com um total de três tratamentos com doze repetições.

Consumo de ração

O consumo de ração foi obtido calculando-se a diferença entre a quantidade de ração total fornecida e a sobra, dividindo este resultado pelo número de frangos. No caso de mortalidades, considerou-se o consumo do frango até o dia da morte.

Peso corporal

Os frangos foram pesados individualmente no primeiro dia de vida, no momento do alojamento, sendo esta pesagem realizada também aos 12, 21, 32 e 45 dias de idade. Para a realização da pesagem foram utilizados dois tipos/modelos de balança: balança Toledo modelo 9094 (variação de 5 g) e balança Toledo modelo 2124 com variação de 20 gramas.

Ganho de peso

O ganho de peso dos frangos foi calculado ao final de cada fase com respectivo tipo de ração em função das pesagens de: 12, 21, 32 e 45 dias de idade. Para obter este resultado foi considerado o peso final dos frangos no período subtraindo o peso do início do período. As mortalidades foram tratadas neste caso, considerando o ganho de peso do frango até o dia de sua morte.

Mortalidade

As anotações e registros de mortalidades foram realizadas diariamente, na primeira hora da manhã, sendo este registro feito em fichas próprias de cada box, com a numeração respectiva deste. Após este procedimento, os frangos mortos foram pesados e o peso registrado.

Conversão alimentar

A avaliação da conversão alimentar foi realizada ao final de cada fase de consumo de ração, sendo retirada, pesada e realizado o cálculo da conversão alimentar após a pesagem dos frangos. O cálculo foi feito através da divisão do consumo de ração pelo ganho de peso do frango, considerando-se o total de frangos por box.

Coleta das amostras

Ao final da fase de crescimento, 42 dias, os frangos foram abatidos em unidade frigorífica com Inspeção Federal, e foram coletados os dados necessários para avaliação de desempenho e qualidade da carcaça, ganho de peso e conversão alimentar dos animais. As coxas e sobrecoxas foram coletadas e armazenadas em sacos de polietileno contendo quatro unidades de coxas e sobrecoxas em cada embalagem, as quais foram seladas com extração parcial de ar. Este procedimento foi realizado para os três tratamentos e o armazenamento ocorreu sob refrigeração a 4°C e sob congelamento a -18°C para posterior caracterização físico-química, microbiológica e sensorial das amostras.

3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS COXAS E SOBRECoxAS DE FRANGO

Para caracterização físico-química das coxas e sobrecoxas de frango, foi primeiramente realizada desossa manual de 12 amostras. Separadas do osso e pele o músculo das coxas e sobrecoxas foi analisado em triplicada para cada um dos parâmetros: pH, a_w , proteína, umidade, acidez, resíduo mineral fixo, lipídeos, índice de peróxidos, dienos conjugados, TBARs, perfil de ácidos graxos livres, oxidação proteica, aminoácidos, CRA, cor e exsudação. As análises foram repetidas no 1º, 4º e 7º dia de armazenamento a 4°C. Para as coxas e sobrecoxas armazenadas congeladas foi realizado primeiramente descongelamento das amostras em geladeira de 4 a 8°C por 24 horas, para posterior desossa e análise aos 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento a -18°C.

pH

O pH foi realizado com auxílio de potenciômetro Digimed (DM-20), utilizando eletrodo de penetração.

Atividade de água(a_w)

A a_w foi realizada triturando a coxa e sobrecoxa em liquidificador e submetendo a leitura em equipamento marca AQUALAB, modelo 3TE a temperatura de 15°C.

Proteína, umidade e resíduo mineral fixo

A determinação de proteína foi realizada conforme metodologia descrita na Instrução Normativa 20, de 21/07/1999 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 1999).

Lipídios

A determinação de lipídios foi realizada pelo método de Bligh & Dyer (1959) que consiste na extração da gordura da amostra em clorofórmio.

Perfil de ácidos graxos livres

Para determinação de perfil de ácidos graxos livres, inicialmente extraiu-se a gordura da amostra em clorofórmio pelo método Bligh & Dyer (1959). Do extrato foram retiradas alíquotas evaporou-se o clorofórmio e realizou-se saponificação, esterificação e posterior recuperação dos ácidos graxos metilados em hexano (Hartman & Lago, 1973).

Dienos conjugados

Os dienos conjugados foram determinados de acordo com metodologia descrita por Recknagel, (1984).

Índice de peróxidos

O Índice de peróxidos foi realizado pelo método descrito por Lanara, (1981), que avalia os peróxidos orgânicos formados no início da rancificação, os quais atuam sobre o iodeto de potássio liberando iodo, que é titulável com tiosulfato de sódio em presença de amido.

TBARs

Para avaliar a extensão da oxidação dos lípideos foi realizado o teste das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARs), segundo o método descrito por Raharjo, Sofos & Schmidt (1992) e modificações sugeridas por Wang et al., (2002).

Oxidação protéica

A oxidação proteica foi determinada pelo método Levine et al., (1990). O teor de proteína da amostra foi determinado pelo método de Lowry (1951), onde preparou-se o branco das amostras e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 370nm, zerando com tampão SDS 2%.

Perfil de aminoácidos

O perfil de aminoácidos foi determinado por hidrólise ácida e leitura em HPLC conforme (Animal Feeding Stuffs, 2005; Commission Regulation, 2009).

Cor

A cor objetiva das coxas e sobrecoxas foi determinada utilizando-se colorímetro Minolta CR400, previamente calibrado, operando com iluminante D65 e ângulo de visão de 10°, expressando, no sistema CIELAB, os valores de (L*a*b*), onde L* indica luminosidade (oscilando de branco 100% a preto 0%), a* (componente vermelho-verde) e b* (componente amarelo-azul).

CRA

A capacidade de retenção de água foi determinada seguindo o método descrito por Barbut, (2002) através da homogeneização da amostra centrifugação e cálculo do percentual de solução retida na amostra.

Exsudação

Realizada através da medida de líquido exsudada pelo produto através da fórmula:

$$\% \text{ exsudação} = \frac{\text{PL (peso líquido)}}{\text{PT (peso total)}} \times 100$$

Minerais

A análise de minerais foi realizada na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) no Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) do Departamento de Química e Ciências Exatas. Os minerais na pele, ossos e na carne das coxas e sobrecoxas dos frangos foram quantificados através de espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) empregando a metodologia descrita por Bizzi et al.(2011). Foram determinados nas amostras os seguintes minerais: prata (Ag), alumínio (Al), arsênio (As), bário (Ba), berílio (Be), bismuto (Bi), cálcio (Ca), cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), lítio (Li), potássio (K), magnésio (Mg), manganês (Mn), sódio (Na), níquel (Ni), fósforo (P), chumbo (Pb), enxofre (S), antimônio (Sb), selênio (Se), estanho (Sn), estrôncio (Sr), tântalo (Ta), titânio (Ti), vanádio (V), zinco (Zn).

3.5. CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS COXAS E SOBRECOCAS DE FRANGO

Para caracterização microbiológica das coxas e sobrecoxas de frango, foi primeiramente realizada desossa manual de 12 amostras. Separadas do osso e pele o músculo das coxas e sobrecoxas foi analisado em triplicada para cada um dos parâmetros. As análises foram repetidas no 1º, 3º, 6º, 9º e 12º dia de armazenamento a 4°C. Para as coxas e sobrecoxas armazenadas congeladas foi realizado primeiramente descongelamento das amostras em geladeira de 4 a 8°C por 24 horas, para posterior desossa e análise aos 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento a -18°C.

Clostridium perfringens

A Contagem de *Clostridium perfringens* foi realizada com meio de cultura TSC e semeadura em Pour Plate, com leitura após 24h de incubação a 36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) conforme metodologia descrita pela IN 62 de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura (Brasil, 2003).

Contagem de Coliformes Termotolerantes

A Contagem de Coliformes Termotolerantes foi realizada por Petrifilm CC, com semeadura de superfície e leitura após 24h de incubação a 44°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), de acordo com Official Method 991.14. 18th. Rev. 03.2010, (AOAC, 2003).

Contagem de *Staphylococcus aureus*

A Contagem de *Staphylococcus aureus* foi realizada por Petrifilm STX, com semeadura de superfície e leitura após 24h de incubação a 36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), de acordo com Método AOAC 2003.07. 18th. Rev. 03.2010, (AOAC, 2003).

Contagem de Mesófilos

A Contagem de Mesófilos foi realizada por Petrifilm AC após semeadura de superfície e leitura após 48h de incubação a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), de acordo com Método AOAC 990.12. 18th. Rev. 03. 2010, (AOAC, 2003).

Contagem de *Escherichia coli*

A Contagem de *Escherichia coli* foi realizada por Petrifilm EC após semeadura de superfície e leitura após 48h de incubação 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), de acordo com Método AOAC Official Method 998.08 e 991.14. 18th. Rev. 03.2010, (AOAC, 2003).

Contagem de *Enterococcus*

A Contagem de Enterococcus foi realizada por Petrifilm EB após semeadura de superfície e leitura após 24h de incubação a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), de acordo com Método AOAC 2003.01. 18th. Rev. 03. 2010, (AOAC, 2003).

Contagem de Coliformes totais

A Contagem de Coliformes totais foi realizada por Petrifilm EC após semeadura de superfície e leitura após 24h de incubação a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), de acordo com Método AOAC Official Method 998.08 e 991.14. 18th. Rev.03.2010, (AOAC, 2003).

Contagem Total de Aeróbios Psicotróficos

A Contagem Total de Aeróbios Psicotróficos foi realizada com meio PCA através de semeadura de superfície e leitura após incubação por 10 dias a 7°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), de acordo com Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4^a ed. Washington (CMMEF, 2001).

Contagem de Bactérias Lácticas

A contagem de Bactérias Lácticas foi realizada com meio MRS através de semeadura em Pour Plate e leitura após incubação por 72h a 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), de acordo com metodologia descrita pelo Brasil, (2003).

Contagem de *Pseudomonas*

A contagem de *Pseudomonas* foi realizada com meio CFC através de semeadura em superfície e leitura após incubação por 44h a 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), de acordo com metodologia descrita pelo Standard Methods (2010).

Shigella, Streptococcus, Klebsiela, Yersinia

A presença de *Shigella, Streptococcus, Klebsiela e Yersinia* foi determinada por tipificação em Vitek 2 (Holt et al., 1994; Brasil, 2003).

Campylobacter (jejuni, coli, lari)

A presença de *Campylobacter (jejuni, coli, lari)* foi realizada em Caldo Bolton através do seu enriquecimento e leitura após incubação por 48h a 42°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), pelo método Bax (VIDAS® *Campylobacter* [CAM] Referência 30111/DUPONT. BAX System User Guide. USA Dupont Qualicon Inc, 2000-2005).

Salmonella

A presença de *Salmonella* foi realizada em duas etapas: 1° em meio BPW com caldo de pré-enriquecimento e leitura após incubação por 22h a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), e 2° em meio SX2 BROTH com caldo de enriquecimento e leitura após incubação por 26h a 42°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), pelo método Official Method of Analysis (AOAC 2011.03 VIDAS® *Salmonella* [SLM] Assay. 18th. Rev. 03. 2010).

Listeria monocytogenes

A presença de *Listeria monocytogenes* foi realizada em duas etapas: 1° em meio Fraser 1/2 com caldo de pré-enriquecimento e leitura após incubação por 25h a 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), e 2° em meio Fraser T com caldo de enriquecimento e leitura após incubação por 25h a 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), pelo método Official Method (AOAC 2004.02 VIDAS® [LIS] Assay. 18th. Rev. 03. 2010).

3.6 CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL DAS COXAS E SOBRECoxAS DE FRANGO

A análise sensorial foi realizada após submissão e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) sob protocolo n°05111912.6.0000.5346.

As coxas e sobrecoxas dos frangos foram avaliadas sensorialmente através de dois testes: Análise Descritiva Quantitativa e Intenção de Compra. Para realização de ambos os

testes, as amostras foram numeradas de forma que os provadores não soubessem qual tratamento estavam avaliando.

Antes de iniciar o período de avaliações, os provadores foram reunidos em sala de treinamento para receber orientação sobre o objetivo da pesquisa, o cronograma das sensoriais, o uso das fichas de avaliação e demais orientações para motivação do grupo e para boa condução dos testes.

3.6.1 Análise Descritiva Quantitativa

A análise descritiva quantitativa foi utilizada pois permite o levantamento, a descrição e a quantificação dos atributos sensoriais detectáveis no produto.

Amostra

A avaliação sensorial foi realizada para os três Tratamentos de coxas e sobrecoxas, T1(Controle), T2 (5g de oliveira/kg de ração) e T3 (10g de oliveira/kg de ração), no 1º e no 12º dia de armazenamento a 4°C, e ao 30º, 60º, 90º e 120º dia para as coxas e sobrecoxas armazenadas a -18°C, evitando horários próximos às refeições.

Apresentação das amostras

As amostras de coxas e sobrecoxas com pele e osso foram preparadas em forno a 180°C até atingirem temperatura interna de 83°C. Foram separados pedaços de carne das coxas e sobrecoxas perfazendo em média 10g de amostra, as quais foram dispostas em cumbucas com codificação numérica de três algarismos e servidas logo após preparo aos provadores.

Condições do teste

A ADQ foi realizada no laboratório de análise sensorial do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da Cooperativa Central Aurora Alimentos, em cabines individuais, com utilização de luz branca.

Análise sensorial das amostras

Inicialmente foi realizada uma pré-seleção com 20 degustadores, consumidores de carne de frango, que apresentaram interesse e disponibilidade de tempo no período de realização das análises. Os 20 provadores treinados, compreendiam 11 do sexo feminino com idade entre 20 e 37 anos e 9 do sexo masculino, com idade entre 19 e 42 anos.

Os provadores foram previamente selecionados utilizando-se teste triangular. O critério usado para seleção de provadores foi no mínimo de 60% de acerto no total de testes realizados.

Levantamento de atributos

O levantamento de atributos foi realizado através do método de Rede. Foram realizadas seis sessões e, em cada uma delas apresentou-se duas amostras de coxas e sobrecoxas, solicitando-se que o provador anotasse as similaridades e as diferenças entre ambas. Solicitou-se que entre uma amostra e outra, o degustador enxaguasse o palato com água (temperatura ambiente) e consumisse pão.

Elaboração das fichas individuais

Após as sessões de levantamento de termos descritivos das amostras de coxas e sobrecoxas e discussão entre o líder e os provadores, foram definidas as listas de atributos e elaboradas as fichas com as escalas de intensidade dos atributos que os provadores relataram ao líder. Utilizou-se neste trabalho escala não estruturada de 10 cm.

No total foram realizadas 22 sessões, sendo 3 para a seleção dos provadores, 6 para levantamento dos atributos, 2 para discussão dos termos e checagem das fichas, 2 sessões para testes preliminares, e 9 para avaliação das amostras (3 para cada tratamento).

A Análise Descritiva Quantitativa proporciona uma completa descrição e quantificação de todas as propriedades sensoriais de um produto, sendo um dos métodos mais completos e sofisticados para a caracterização sensorial de atributos sensoriais (Stone et al., 1974).

3.6.2 Intenção de compra

A avaliação de intenção de compra seguiu metodologias descritas por Stone & Sidel, (1985) e Ferreira, (2000), onde os degustadores expressaram sua intenção de compra das coxas e sobrecoxas através de uma escala estruturada de cinco pontos.

As coxas e sobrecoxas de frango foram assadas em forno até atingirem 83°C internamente, foram cortadas em cubos e servidas codificadas aos degustadores que avaliaram em relação aos atributos globais de sabor, odor, textura cor e aparência qual a amostra que mais agradava e representava intenção de compra.

3.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL SANGUÍNEO DE RATOS

O ensaio biológico foi realizado submetendo ratos a uma dieta contendo carne dos frangos alimentados com diferentes concentrações de folhas de oliveira. Foram utilizados 48 ratos, machos albinos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, em fase de crescimento e com peso médio inicial de 180 a 220g. Após os animais serem desmamados, eles receberam dieta comercial nuvilab por 2 semanas e, então, foi iniciado o ensaio suplementando a carne de frango liofilizada na quantidade de 20%. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos conforme apresentado na Tabela 3, com doze animais por grupo acomodados em gaiolas com cama de maravalha autoclavada, totalizando 4 animais por gaiola.

Tabela 3: Grupos de animais distribuídos para suplementação com carne de frango liofilizada.

TRATAMENTOS	CONDIÇÕES
CN	Controle negativo – ração padrão de roedores
T1	ração suplementada com 20% de carne de frango que recebeu ração convencional
T2	ração suplementada com 20% de carne de frango que recebeu ração com 0,5% de folha de Oliveira
T3	ração suplementada com 20% de carne de frango que recebeu ração com 1,0% de folha de Oliveira

Os animais foram mantidos em condições de biotério, ciclo dia/noite de 12h, com controle de temperatura de 22°C, exaustão, água “ad libitum” e acesso a ração por um período de 25 dias. Durante todo o experimento, foi realizado semanalmente, o controle do peso corporal e do consumo da ração dos animais para o cálculo do coeficiente de eficiência alimentar e elaboração da curva de crescimento.

Ao término do experimento, os animais foram anestesiados com Tiletamina e zolazepam via intraperitoneal na dose de 50 mg/kg em câmara fechada. Foi realizada cirurgia de Laparotomia para coleta do sangue da artéria aorta. O sangue foi centrifugado para obtenção do soro, que foi analisado quanto ao colesterol total, triacilgliceróis, colesterol na fração HDL, colesterol nas frações LDL + VLDL segundo técnica do Instituto Adolf Lutz (1985). Após a coleta do sangue os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, recolhidos como lixo hospitalar, congelados e incinerados conforme preconiza a resolução 304 da Anvisa.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada análise foi realizada com média de 12 amostras de coxas e sobrecoxas de frango, sendo realizada triplicata para cada análise. Os resultados obtidos da análise sensorial, físico-química e microbiológica foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o delineamento de blocos inteiramente casualizados, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

4 ARTIGOS

Artigo 1. Efeito da incorporação de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) no desenvolvimento e qualidade da carne de frangos.

Manuscrito enviado segundo normas da Revista Brazilian Journal of Food Technology

Artigo 2. Quality of meat from chicken fed on olive leaves.

Manuscrito enviado segundo normas da Revista Journal of the Science of Food and Agriculture

4.1 Efeito da incorporação de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) no desenvolvimento e qualidade da carne de frangos

Effect of incorporating olive leaves (*Olea europaea* L.) in the development and quality of poultry meat

Cristiane Marangoni^{1*}, Alexandre José Cichoski¹, Juliano Smanioto Barin¹, Cristiano Ragagnin Menezes¹.

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, CEP: 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

* Correspondência: Cristiane Marangoni, e-mail: eng.cristiane@gmail.com

Alexandre José Cichoski, e-mail: cijoale@gmail.com

Juliano Smanioto Barin, e-mail: juliano@ufsm.br

Cristiano Ragagnin Menezes, e-mail: cristiano.ufsm@gmail.com

Resumo

Foi realizada suplementação de folhas de oliveira na ração de frangos na quantidade de 5 e 10g de folhas/kg de ração, e acompanhou-se o desempenho dos animais durante seu crescimento. Depois do abate, as coxas e sobrecoxas foram coletadas e armazenadas a 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 12 dias, onde se acompanhou a evolução de diferentes bactérias. Os resultados mostraram melhor conversão alimentar dos frangos que receberam dieta suplementada com 5g/kg. As coxas e sobrecoxas dos frangos que receberam folhas de oliveira apresentaram melhor estabilidade microbiológica que o controle, onde 5g/kg inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, aeróbios psicrotróficos e mesófilos, e 10g/kg inibiu o crescimento de *Enterococcus* spp, bactérias ácido lácticas, coliformes termotolerantes e totais, *Pseudomonas*, *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* ($p < 0,05$). Os resultados indicam possibilidade de uso de folhas de oliveira, como suplemento alimentar, com vistas à melhoria da qualidade microbiológica da carne de frango.

Palavras chave: folhas de oliveira, frangos, bactérias.

Summary

Olive leaf supplementation was held in broiler feed in the amount of 5 and 10g of leaves/kg diet, and monitored the performance of animals during their growth. After slaughter, thighs and drumsticks were stored at 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) for 12 days, where he followed the evolution of different bacteria. The results showed better feed the chickens fed diet supplemented with 5g/kg. Thighs and drumsticks of chickens that received olive leaves as a supplement, have

better microbiological stability than the control treatment. The 5g/kg inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, psychrotrophic and mesophilic aerobic, whereas with 10g/kg inhibited the growth of *Enterococcus* spp, lactic acid bacteria, coliforms, *Pseudomonas*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* ($p < 0.05$). Results indicate possibility of using olive leaves as a food supplement, aimed at improving the microbiological quality of chicken meat.

Keywords: olive leaves, chicken, bactéria.

1.0 Introdução

A carne de frango pode veicular patógenos como *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella* spp. e *Yersinia* spp., possíveis causadores de danos à saúde e toxinfecções alimentares, além de micro-organismos associados à deterioração, que são responsáveis por consideráveis perdas econômicas nas indústrias processadoras de carne e produtos derivados, como *Pseudomonas* (OLIVEIRA et al. 2009; OLIVEIRA et al., 2004; DELAZARI, 2003).

A suplementação de antimicrobianos na dieta de animais em crescimento tem despertado como uma alternativa a minimizar o crescimento microbiano, sem oferecer risco para a saúde dos consumidores, além de proporcionar uma matéria prima com melhores condições de qualidade (NASCIMENTO, 2013; VILLA & OLIVEIRA, 2012). A oliveira (*Olea europaea* L.), planta frutífera da família botânica *Oleaceae*, que começou a ser cultivada no Brasil em 1800, possui propriedades antimicrobianas atribuídas aos seus compostos fenólicos, particularmente o hidroxitirosol e a oleuropeína (PEREIRA et al, 2007). Sudjana et al, (2009) demonstrou atividade antimicrobiana das folhas de *Olea europaea* L. frente *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* e *Staphylococcus aureus*. Outros ensaios demonstram que extratos das folhas de oliveira apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antiviral (BOCK et al., 2013; KONTOGIANI & GEROTHANASIS, 2012; KOMAKI et al., 2003; LEE-HUANG et al., 2003), propriedades atribuídas à composição rica em compostos fenólicos.

Bisignano et al., (1999) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* da oleuropeína e do hidroxitirosol extraídos de folhas de oliveira, e identificaram eficiência frente *Staphylococcus aureus*. Em outro estudo Bisignano et al., (2001) identificaram componentes antimicrobianos das folhas da oliveira, e constataram a eficácia dos aldeídos alifáticos de cadeia longa frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Ao investigar a atividade *in vitro* de um extrato comercial de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) que continha 4.4 mg/mL de oleuropeína, frente a uma vasta gama de micro-organismos, Sudjana et al., (2009) constataram que o composto apresentou atividade inibitória para *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, e *Staphylococcus aureus*. A atividade *in vitro* de folhas de oliveira também foi estudada por Markin, Duek & Berdicevsky, (2003) que observaram eficiência especialmente frente à *Klebsiela* e *Pseudomonas*.

O Brasil está entre os três maiores produtores mundiais de carne de frango e desde 2004, ocupa a posição de maior exportador mundial fornecendo para mais de 150 países (UBABEF, 2012). Segundo relatório anual da Ubabef (2012), a região Sul do Brasil é responsável por 61,53% do volume de frango produzido, cujo principal destino se concentra no oriente Médio na forma de cortes, frango inteiro, frango industrializado e outros produtos. Porém, esta carne pode se tornar veículo de transmissão de inúmeros micro-organismos, alguns deles patógenos ao homem. Considerando que as toxinfecções alimentares de origem microbiana têm sido reconhecidas como um problema de saúde pública abrangente e causa importante na diminuição da produtividade e perdas econômicas que afetam países, empresas e consumidores (NASCIMENTO, 2006), realizou-se o acompanhamento do desempenho de frangos que receberam em suas dietas folhas de oliveira como suplemento, e posteriormente avaliou-se a evolução de diferentes bactérias nas coxas e sobrecoxas durante seu armazenamento por 12 dias a 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

2.0 Materiais e Métodos

Folhas de Oliveira (*Olea europaea* L.) da variedade *Ascolana* foram colhidas na EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina) de uma plantação de Oliveiras de 5 anos, entre os meses de janeiro a março de 2012. Foram removidos os possíveis contaminantes físicos, e posteriormente realizou-se secagem em estufa a 45°C com circulação de ar por 72 horas. Após, o material seco foi moído em moinho de navalhas do tipo Willey com peneiras de 1mm. As folhas moídas foram analisadas em relação ao conteúdo de umidade, proteína, resíduo mineral fixo e gordura de acordo com metodologias descritas em Brasil (1999).

2.1 Animais e Dieta

No estudo foram utilizados frangos de corte linhagem *Cobb*, alojados em uma agroindústria no oeste de Santa Catarina (SC), Brasil. Dois mil quinhentos e vinte frangos foram divididos em 3 grupos de 840 frangos cada. Um grupo serviu de controle e foi

alimentado com dieta tradicional (T1), enquanto os outros dois grupos foram alimentados com dietas suplementadas com folhas de oliveira nas quantidades de 5g/kg de ração (T2) e de 10g/kg de ração (T3). Durante os 42 dias de crescimento foi acompanhado o desempenho dos animais. Aos 42 dias realizou-se o abate dos animais e coletaram-se as coxas e sobrecoxas com ossos e com pele para armazenamento a 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) durante 12 dias para acompanhamento da evolução da flora microbiana.

2.2 Avaliação do Desempenho

Para avaliação do desempenho dos frangos, foram analisados: PI (peso Inicial), PF (Peso Final), CRT (Consumo de Ração Total), CRD (Consumo Ração Diário), GP (Ganho de Peso), GPD (Ganho de Peso Diário), CA (Conversão Alimentar), TM (Taxa de Mortalidade).

2.3 Análises Microbiológicas

As coxas e sobrecoxas dos três tratamentos foram analisadas nos dias 0 (zero), 3, 6, 9 e 12 para os micro-organismos a seguir.

Clostridium perfringens foi realizada com meio de cultura TSC e semeadura Pour Plate de profundidade e leitura após 24h de incubação a 36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), conforme metodologia descrita pela IN 62 de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura (Brasil, 2003).

Coliformes Termotolerantes foi realizada por Petrifilm CC, com semeadura de superfície e leitura após 24h de incubação a 44°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), de acordo com Método AOAC 991.14. 18th. Rev. 03.2010, *Staphylococcus aureus* foi realizada por Petrifilm STX, com semeadura de superfície e leitura após 24h de incubação a 36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), de acordo com Método AOAC 2003.07. 18th. Rev. 03.2010, Mesófilos foi realizada por Petrifilm AC por semeadura de superfície e incubação a temperatura de 48°C a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e posterior leitura, de acordo com Método AOAC 990.12. 18th. Rev. 03. 2010, *Escherichia coli* foi realizada por Petrifilm EC através de semeadura de superfície, realizando-se leitura após incubação por 48h a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), de acordo com Método AOAC Official Method 998.08 e 991.14. 18th. Rev. 03.2010; *Enterococcus* spp foi realizada por Petrifilm EB através de semeadura de superfície e realizou-se leitura após incubação por 24h a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) de acordo com Método AOAC 2003.01. 18th. Rev. 03. 2010, Coliformes totais foi realizada de acordo com Método AOAC 998.08 e 991.14. 18th. Rev.03.2010, (AOAC, 2003).

Aeróbios Psicotróficos foi realizada por PCA através de semeadura de superfície e incubação por 10 dias a 7°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e posterior leitura, de acordo com CMMEF (2001).

Bactérias Láticas foi realizada com meio MRS através de semeadura Pour Plate de profundidade entre 48 a 72h a 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) conforme metodologia descrita pelo Brasil, (2003).

Pseudomonas foi realizada com meio CFC através de semeadura de superfície após incubação por 44h a 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) conforme metodologia do Standard Methods (2010).

Shigella, *Streptococcus*, *Klebsiela* e *Yersinia* foram determinadas por tipificação em Vitek2 (BRASIL, 2003).

Campylobacter (*jejuni*, *coli*, *lari*) foi determinada pelo método Bax (VIDAS® *Campylobacter* [CAM] Referência 30111/DUPONT. BAX System UserGuide. USA Dupont QualiconInc, 2000-2005).

Salmonella foi determinada pelo método AOAC 2011.03 VIDAS® *Salmonella* [SLM] Assay. 18th. Rev. 03. 2010) e *Listeria monocytogenes* foi determinada pelo método AOAC 2004.02 VIDAS® [LIS] Assay. 18th. Rev. 03. 2010) (AOAC, 2003).

2.4 Análise estatística

Os resultados foram obtidos em triplicata e submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o delineamento de blocos inteiramente casualizados, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro através do programa Statistica - Stat Soft versão 7.

3.0 Resultados e Discussões

As folhas de oliveira da variedade Ascolano secas e moídas apresentaram em base seca 4,65% de umidade, 4,69% de resíduo mineral fixo, 1,38% de lipídeos, 23,3% de fibra bruta e 12,73 g/100g NT x 6,25 de proteína bruta. Em estudo realizado por Botsoglou et al., (2010) folhas de oliveira foram secas a 45°C durante 3 dias consecutivos, e moídas em peneira de 2 mm. Após análise, indicaram resultados em base seca próximos aos encontrados neste estudo para os parâmetros de umidade e resíduo mineral fixo, sendo 5,0% e 5,4% respectivamente. A umidade encontrada neste estudo de 4,65% garante boa qualidade às folhas secas, uma vez que esse teor não é favorável ao desenvolvimento de fungos, bolores e leveduras.

A Tabela 1 apresenta a matriz nutricional que compreende a base da alimentação dos frangos. À esta matriz foi realizada adição das folhas de oliveira e realizada avaliação do desempenho dos animais e posteriormente da carne.

Tabela 1. Matriz nutricional referente a alimentação dos frangos.

Composição	Quantidade (g)
Milho	558,000
Farelo de soja	315,342
Farinha de vísceras de aves	68,000
Farinha de penas	0,0-00
Óleo de soja	28,000
Gordura de aves	0,000
Calcário calcítico	7,500
Sal granulado iodado	4,400
L-Lisina HCL 50%	6,700
Metionina MHA	4,600
Cloreto colina 75%	0,450
Aditivo antimicotoxinas	2,000
L-Treonina	2,078
Rovabio Excel AP xilase + B-glicanase	0,050
Ronozyme ProAct - protease	0,200
Etoxiquine	0,150
Ronozyme HiPhos (M) fitase	0,020
Lincomicina 44%	0,010
Anticoxilidiano	0,500
Premix *	2,000

Nota 1: Ração elaborada para alimentação dos frangos.

*Premix: Composto por vitamina A (4.275 KUI), vitamina D₃ (1.395 KUI), vitamina E (22.500 mg), vitamina K₃ (1.350 mg), vitamina B₁ (1.350 mg), vitamina B₂ (3.600 mg), vitamina B₆ (1.800 mg), vitamina B₁₂ (9.900 µg), ácido pantotênico (9.000 mg), niacina (18.000 mg), ácido fólico (900 mg), biotina (76.500 µg), cobre (7.200 mg), ferro (27.000 mg), manganês (27.000 mg), iodo (450 mg), zinco (45.000 mg) e selênio (180 mg).

A Tabela 2 apresenta o desempenho dos frangos pertencentes aos três tratamentos durante os 42 dias que receberam ração, constatou-se que no início do experimento os frangos pertencentes aos três tratamentos apresentaram o mesmo peso inicial (PI), e no 42º dia quando foram abatidos, os frangos dos tratamentos T1 e T3 apresentaram maior peso final (PF), em relação aos frangos pertencentes ao tratamento T2. Este resultado pode ter sido influenciado pela quantidade de consumo de ração total (CRT), uma vez que ocorreu maior consumo de ração nos tratamentos T1 e T3 (Tabela 2).

A partir do consumo de ração total (CRT) e do ganho de peso (GP) dos frangos foi obtida a conversão alimentar (CA). Para este parâmetro os frangos que receberam dieta suplementada com folhas de oliveira na quantidade de 5 g/kg (T2) apresentaram os melhores valores, diferindo significativamente dos frangos pertencentes ao T3. Para os frangos que receberam dieta com folhas de oliveira na quantidade de 10g/kg (T3) não foi registrada

mortalidade (TM) durante o acompanhamento, diferenciando significativamente ($p < 0,05$) dos tratamentos T1 e T2. Folhas de oliveira foram usadas na dieta de codornas e promoveram melhoria significativa na produção de ovos em relação ao tratamento controle, mas não demonstraram diferença na taxa de mortalidade em relação ao controle (CHRISTAKI, BONOS & FLOROU-PANERI, 2011). Os benefícios do uso das folhas de oliveira foram atribuídos à presença de polifenóis e oleuropeína, conforme já indicado por Malik & Brandford (2008).

Tabela 2. Desempenho dos frangos pertencentes aos três tratamentos durante os 42 dias que receberam a ração.

Desempenho Zootécnico								
	PI (g)	PF (g)	CRT (g)	CRD (g)	GP (g)	GPD (g)	CA*	TM (%)
T1	46,0 ^a (0,00)	2773,2 ^a (0,00)	4304,3 ^a (0,00)	100,1 ^a (0,51)	2727,1 ^a (0,00)	63,4 ^a (0,00)	1,58 ^a (0,00)	0,24 ^a (0,00)
T2	46,0 ^a (0,00)	2756,2 ^b (0,010)	4271,5 ^b (0,10)	99,3 ^b (0,00)	2710,2 ^b (0,00)	63,1 ^b (0,00)	1,57 ^b (0,00)	0,12 ^a (0,00)
T3	46,0 ^a (0,00)	2799,1 ^a (0,00)	4343,9 ^a (0,00)	101,0 ^a (0,00)	2753,1 ^a (0,00)	64,0 ^a (0,00)	1,58 ^a (0,00)	0,0 ^b (0,00)

Nota 1: a,b,c são analisadas na vertical. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

Nota 3: PI (peso Inicial), PF (Peso Final), CRT (Consumo de Ração Total), CRD (Consumo Ração Diário), GP (Ganho de Peso), GPD (Ganho de Peso Diário), CA (Conversão Alimentar), TM (Taxa de Mortalidade).

*Consumo de ração em um determinado tempo/ganho de peso.

O acompanhamento zootécnico realizado durante os 42 dias, demonstrou que os frangos que receberam 10g de folhas de oliveiras/kg de ração em suas dietas, apresentaram melhor desempenho do que os frangos do tratamento controle, para o parâmetro TM, e desempenho equivalente a T2 para os demais parâmetros avaliados, indicando que esta suplementação poderia ser uma alternativa de uso na ração de frangos de corte.

A segurança e qualidade dos alimentos como a carne in natura de frango pode ser estimada pela contagem de micro-organismos indicadores como aeróbios mesófilos e psicrotróficos (CARDOSO et al., 2014). Na Figura 1 é apresentado o número de colônias

(log₁₀ UFC/g) de aeróbias mesófilas (AM), bactérias ácido lácticas (BAL), aeróbias psicrótróficas (AP) e *Pseudomonas* (CP).

A contagem de aeróbios mesófilos de 10⁷ UFC/g ou 7 log₁₀UFC/g é estabelecida por International (1986), como indicador para o fim da vida útil da carne de frango resfriada. Alguns estudos são mais criteriosos considerando fora das condições higiênico sanitárias ideais os frangos que ultrapassam 10⁶ UFC/g (RITTER & BERGMANN, 2003). Pela Figura 1-AM, verifica-se que os tratamentos que receberam dieta suplementada com folhas de oliveiras (T2 e T3), atingiram contagens máximas de 5,63 e 5,87 log₁₀UFC/g, respectivamente, enquanto o tratamento controle apresentou contagens de 6,07 log₁₀ UFC/g a partir do 3º dia de armazenamento. Em todos os dias analisados o número de colônias de bactérias mesófilas dos tratamentos T2 e T3 diferiram significativamente (p<0,05) do número encontrado no tratamento controle. Entre T2 e T3 também houve diferença significativa (p<0,05), até o 9º dia de armazenamento, indicando que o uso de 10g/kg foi mais eficiente que o uso de 5g/kg. Em virtude da contagem de aeróbios mesófilos estimarem a população microbiana total e elevadas contagens indicarem baixa qualidade e reduzida vida de prateleira do alimento (CARDOSO et al., 2014; GILL, 1998), pode-se dizer que as folhas de oliveira adicionadas na dieta de frangos proporcionaram melhor estabilidade da carne, e um aumento da vida de prateleira das coxas e sobrecoxas armazenadas a 4°C, em relação ao tratamento que recebeu a dieta convencional.

O número de colônias de bactérias lácticas nos tratamentos com folhas de oliveiras (T2 de 1,64 a 4,49 log₁₀ UFC/g e T3 de 1,50 a 3,77 log₁₀ UFC/g) em todos os dias analisados foram menores do que os encontrados no tratamento controle (T1 de 2,00 a 6,54 log₁₀ UFC/g), e diferiram significativamente (p<0,05) entre si. Esses resultados demonstram que as folhas de oliveiras quando administradas via dieta, apresentam efeito frente às bactérias lácticas (Figura 1, BAL). Entre os tratamentos com folhas de oliveiras, T3 (10g de folhas de oliveira/kg de ração) apresentou durante os 12 dias menor número de colônias de bactérias lácticas, diferindo estatisticamente (p<0,05) de T2 (5 g de folhas de oliveira/kg de ração). Este resultado pode ser devido à oleuropeína, principal componente das folhas de oliveira, indicada como positiva na ação contra bactérias ácido lácticas (RUIZ-BARBA et al., 1990; Ruiz-BARBA, GARRIDO-FERNANDEZ & JIMENEZ-DIAZ, 1991), estar presente em maior percentual em T3. Botsoglou et al., (2010), adicionaram 5 e 10g de folhas de oliveira/kg na ração de perus, e avaliaram o crescimento microbiano nos filés de peito armazenados a 4°C por 12 dias. No 12º dia de armazenamento o número de bactérias lácticas no tratamento

controle foi de 6,5 log₁₀UFC/g, e nos tratamentos com 10 e 5g de folhas de oliveiras foram de 4 e 5 log₁₀ UFC/g respectivamente. Neste estudo o número de bactérias lácticas nas coxas e sobrecoxas de frangos no 12º dia foram de 3,77 e 4,49 log₁₀UFC/g para os tratamentos T3 e T2 respectivamente, sendo esses valores menores do que os encontrados por Botsoglou et al., (2010) no mesmo tempo de armazenamento e na mesma temperatura.

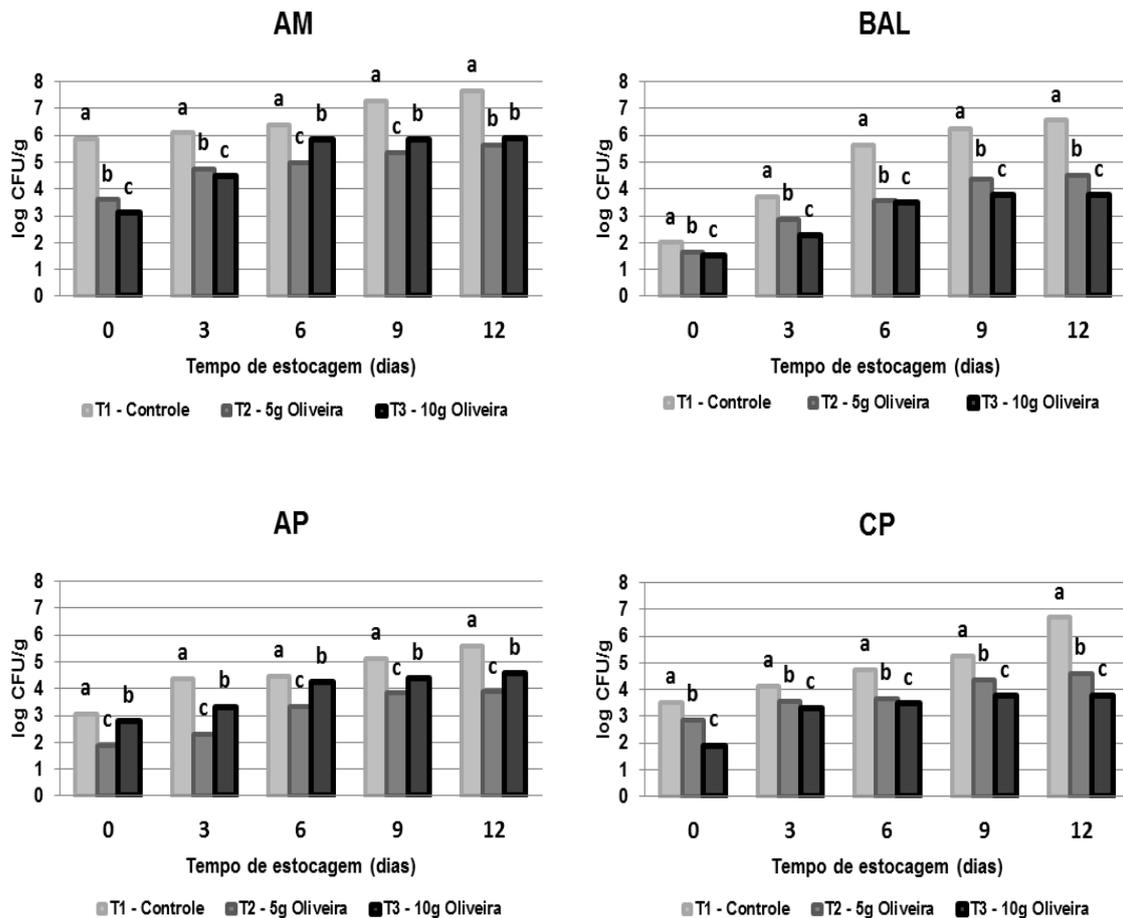


Figura 1: Número de colônias (log₁₀ UFC/g) de aeróbias mesófilas (AM), bactérias ácido lácticas (BAL), aeróbias psicotróficas (AP) e *Pseudomonas* (CP), em coxas e sobrecoxas de frangos armazenadas a 4°C por 12 dias.

De acordo com Icmsf (1978), que estabelece 10⁶ a 10⁷ UFC/g como padrão de deterioração de carne refrigerada, as coxas e sobrecoxas se mantiveram adequadas para consumo em relação aos psicotróficos (Figura 1-AP) durante os 12 dias. Os tratamentos que receberam folhas de oliveira apresentaram redução significativa (p<0,05) na contagem deste micro-organismo em relação ao tratamento controle. Resultados semelhantes de redução de bactérias psicotróficas foram encontrados por Botsoglou et al. (2010), ao avaliar o efeito de

folhas de oliveira em filés de peru, encontrando número de colônias de 4,6 e 5,7 \log_{10} UFC/g nos tratamentos que receberam 10 e 5 g de folhas de oliveira/kg de ração, sendo esses valores maiores do que os encontrados neste estudo, que foram de 4,55 para T3 e 3,87 \log_{10} UFC/g para T2 (Figura 1-AP).

A análise de Aeróbios totais e *Pseudomonas* spp. também são indicadores de deterioração de carne de frangos (DOMINGUEZ & SCHAFFNER, 2007). A contagem de *Pseudomonas* spp., é definida por vários autores como indicativa de término de vida útil quando atinge valores de 6 a 7 \log_{10} UFC/g (ALLEN, RUSSELL & FLETCHER, 1997; MEHYAR; 2005). Considerando os valores de CP apresentados na Figura 1, os três tratamentos se mantiveram apropriados para consumo até os 12 dias de armazenamento a 4 °C. Os tratamentos que receberam folhas de oliveira (T2 e T3) apresentaram número de colônias de *Pseudomonas* significativamente menores ($p < 0,05$) do que o controle (T1) em todos os dias de armazenamento, sendo que o uso de 10g/kg teve capacidade inibitória significativamente maior que o uso de 5g/kg. Esses resultados indicam efeito positivo das folhas de oliveira, uma vez que espécies de *Pseudomonas* spp. são dominantes em carne de frango deterioradas, e estão relacionadas a produção de uma ampla variedade de odores e sabores, devido a ação de suas enzimas lípases e proteases (MELLOR et al., 2011). Pereira et al., (2007) também verificou efeito positivo do extrato de folhas de oliveira frente *Pseudomonas*.

A carne dos frangos que receberam folhas de oliveira na dieta apresentou número de colônias de aeróbias mesófilas, bactérias lácticas, aeróbias psicotróficas e *Pseudomonas* significativamente ($p < 0,05$) menores do que os encontrados no tratamento controle. Esses resultados demonstram efeito positivo da oliveira frente microorganismos deteriorantes, uma vez que são as bactérias psicotróficas e especialmente as *Pseudomonas* que deterioram as carcaças de frango durante o período de armazenamento e influenciam na determinação da vida de prateleira dos cortes (MIYAGUSKU et al., 2003). Gök & Bor (2012) também verificaram efeito positivo das folhas de oliveira frente aeróbias mesófilas, *Pseudomonas* e Psicotróficas em almôndegas armazenadas refrigeradas.

A presença de coliformes totais em alimentos, embora menos significativa do que de coliformes termotolerantes, é considerada uma indicação útil de contaminação pós-sanitização ou pós-processo, evidenciando práticas de higiene e sanitização aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimento (SILVA et al., 2007). A carne de frango que recebeu dieta suplementada com folhas de oliveira em ambas as concentrações, apresentou

valores de contagens de coliformes totais significativamente menores que o tratamento controle durante os 12 dias de estocagem. Botsoglou et al., (2010) também obteve redução significativa de coliformes totais na carne de peru que recebeu dieta com folhas de oliveira em relação ao controle e Ahmed et al., (2014) obteve redução de coliformes totais com o uso de extrato de folhas de oliveira em camarão armazenado refrigerado. Segundo Florentino et al., (1997), a presença de coliformes termotolerantes indica contaminação fecal e presença de bactérias patogênicas. A Resolução nº 12/2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), preconiza para cortes de frango resfriados ou congelados um limite de tolerância para a contagem de Coliformes a 45°C/g de 10^4 ou $4 \log_{10}$ UFC/g. De acordo com esta tolerância, o tratamento controle estaria impróprio para comercialização e consumo pois apresentou contagens iniciais de $4,5 \log_{10}$ UFC/g, enquanto os tratamentos que receberam folhas de oliveira tiveram contagens iniciais de 1,93 e 2,36 para T3 e T2, respectivamente, e apresentaram contagens dentro do limite de tolerância da legislação até o 6º dia de armazenamento a 4°C. A análise de Coliformes Termotolerantes indicou que T2 e T3 tiveram efeito inibitório significativo ($p < 0,05$) em relação a T1 durante os 12 dias de armazenamento a 4°C, demonstrando que ambas as concentrações de oliveira são inibitórias para Coliformes Termotolerantes.

O *Clostridium perfringens* é uma bactéria gram positiva que faz parte da microbiota normal do trato intestinal dos animais e é habitante do solo. É causador de processos de intoxicação alimentar pela produção de uma toxina endógena. Em animais saudáveis encontra-se em maiores porções no cólon (SALES & PORTO, 1999). Alsheikhly et al., (1977) e Benedict (1988) encontraram grande número destes micro-organismos nos pés, penas e pele do pescoço das aves. O uso de folhas de oliveira na quantidade de 10g/kg de ração indicou melhor efeito inibitório que o uso de 5g/kg de ração para *Clostridium perfringens*, mas ambas as quantidades demonstram capacidade inibitória significativamente ($p < 0,05$) melhor que T1 (Figura 2-CCP).

As coxas e sobrecoxas dos frangos que receberam adição de folhas de oliveira na dieta (T2 e T3) indicaram reduções significativas ($p < 0,05$) nas contagens de *Enterococcus* spp demonstrando eficiente redução deste micro-organismo em relação ao tratamento de frangos que recebeu dieta tradicional (T1). A quantidade de 10g/kg teve melhor eficiência que o uso de 5g/kg, sendo verificados aos 12 dias valores de 3,61, 4,71 e 5,94 \log_{10} UFC/g para T3, T2 e T1, respectivamente. Faiza et al., (2011) avaliou oliveira frente *Enterococcus* e diversos outros micro-organismos e também verificou efeito positivo.

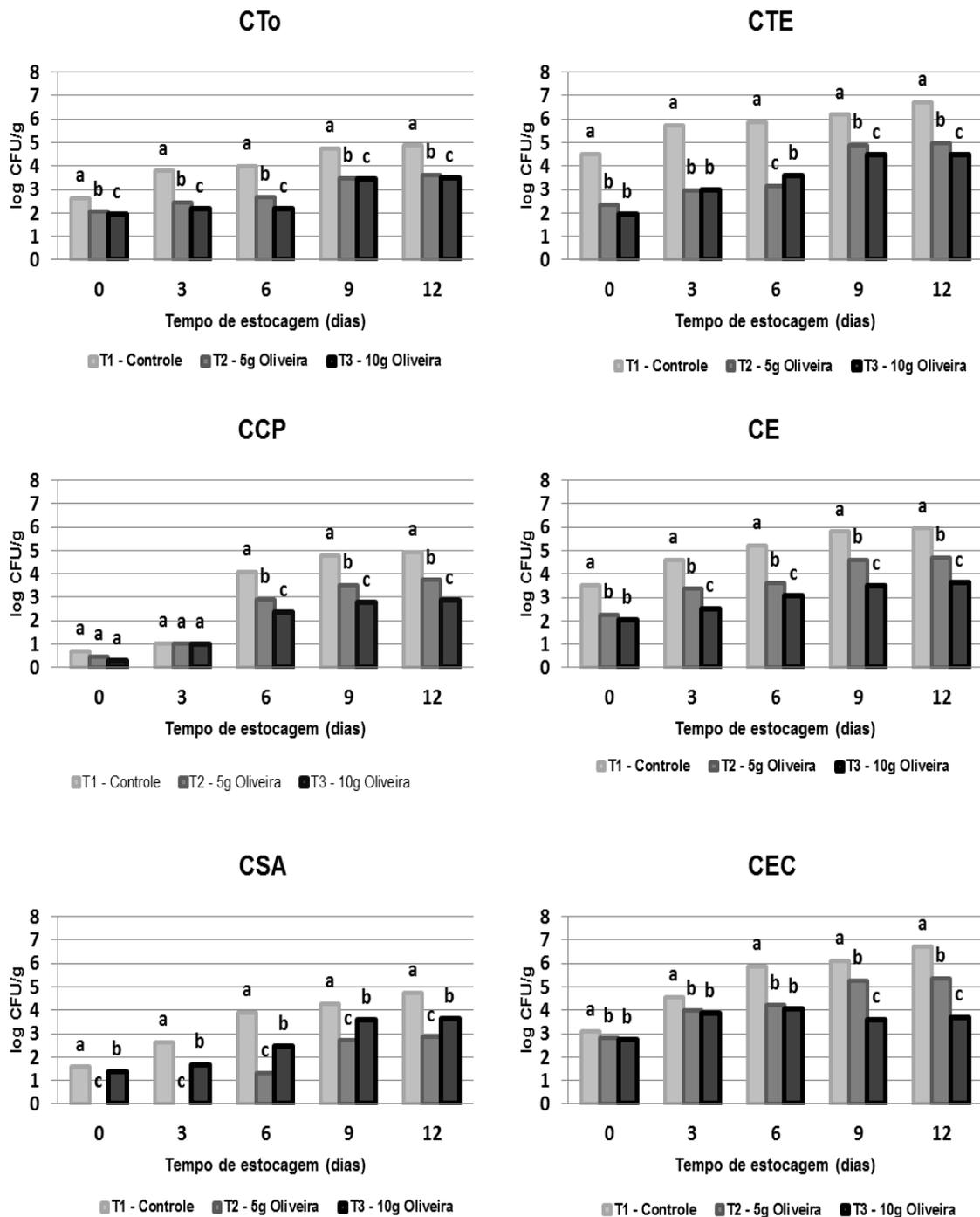


Figura 2: Número de colônias (\log_{10} UFC/g) de Coliformes Totais (CTo), Coliformes Termotolerantes (CTE), *Clostridium perfringens* (CCP), *Enterococcus* spp (CE), *Staphylococcus aureus* (CSA) e *Escherichia coli* (CEC) em coxas e sobrecoxas de frangos armazenadas a 4°C por 12 dias.

Autores relatam que são necessárias entre 10^5 e 10^6 UFC/g de *Staphylococcus aureus* por grama de alimento para que a toxina seja formada em níveis capazes de provocar intoxicação (FRANCO & LANDGRAF, 2005; LINDQVIST et al., 2002). Considerando este

padrão, e analisando a Figura 2-CSA, pode-se dizer que durante os 12 dias, as coxas e sobrecoxas dos tratamentos de frango que receberam dieta suplementada com folhas de oliveira apresentaram contagens significativamente menores ($p < 0,05$) que o controle, o que é indicativo de condições mais seguras para o consumo da carne de frango em relação a este micro-organismo. As contagens máximas encontradas para as coxas e sobrecoxas de frango foram de 2,84, 3,64 e 4,74 log CFU/g para T2, T3 e T1, respectivamente. A inibição de *Staphylococcus aureus* foi significativamente ($p < 0,05$) menor para o tratamento que recebeu adição de 5g de oliveira/kg de ração em relação a T1 e T3. Com 12 dias a diferença entre T3 e T1 foi de 1,1 log₁₀UFC/g, demonstrando efeito inibitório da oliveira em relação ao controle. O efeito positivo das folhas de oliveira frente *Staphylococcus aureus* também foi relatado por Bisignano, (1999), Pereira et al., (2007), Botsoglou, (2010) e Gökmen et al., (2014).

A presença de *Escherichia coli* nos alimentos indica contaminação microbiana de origem fecal e condições higiênicas insatisfatórias, sendo diversas linhagens patogênicas (FRANCO & LANDGRAF, 2005). A presença de *Escherichia coli* (Figura 2-CEC) iniciou com valores próximos entre os três tratamentos 3,07, 2,79 e 2,73 log CFU/g para T1, T2 e T3 respectivamente, mas com reduções significativas ($p < 0,05$) das contagens nas coxas e sobrecoxas que receberam folhas de oliveira em relação ao controle, demonstrando que o uso de oliveira em ambas as concentrações teve efeito inibitório. Pereira et al., (2007) e Gökmen et al., (2014) também obtiveram efeito positivo do extrato das folhas de oliveira frente *Escherichia coli*.

Não foi evidenciada presença de *Salmonella* spp. na carne, confirmando a qualidade microbiana dos produtos, pois a ausência atesta condições higiênico-sanitárias satisfatórias (SILVA JUNIOR, 2001).

A *Listeria monocytogenes* é um patógeno psicrotrófico, que pode causar doenças (SCHAWAB & EDELWEISS, 2003; FARBER & PETERKIN, 1991; RYSER & MARTH, 1991), pode crescer em temperatura mínima de 1°C, e pode desenvolver-se em carne refrigerada (PELISSER, 2001; MURIANA, 1996). As amostras de coxas e sobrecoxas de frango dos três tratamentos analisados apresentaram ausência de *Listeria monocytogenes* durante os 12 dias, atestando segurança do produto quanto à listeriose. Gökmen et al., (2014) relatou efeito positivo de extratos de folhas de oliveira frente *Listeria monocytogenes*.

Campylobacter é uma das principais bactérias causadoras de gastroenterite em humanos. Estão presentes naturalmente no trato gastrointestinal de aves e outros animais de produção. Dentre as espécies mais conhecidas estão *coli*, *jejuni* e *lari* (LAWSON, LINTON &

STANLEY, 1997). Não foi detectada a presença de nenhuma espécie de *campylobacter* nos tratamentos armazenados por 12 dias a 4°C.

A pesquisa de *Shigella*, *Klebsiela*, *Yersinia* e *Streptococcus*, indicou ausência destes micro-organismos para os três tratamentos durante o período avaliado.

O efeito antimicrobiano das folhas de oliveira frente diversas bactérias, conforme relatado em estudos realizados por Benavente-Garcial et al., (2000) e Cardoso et al. (2005), e verificados nesta pesquisa, pode ser atribuído à presença de compostos fenólicos como a oleuropeína, que apresenta-se em grande concentração nas folhas de oliveira (TAN et al., 2003). Sournin et al., 2001 relatou que folhas de oliveira podem conter até 10% de polifenóis, principalmente oleuropeína e hidroxitirosol. Neste estudo verificou-se a presença de 15% de oleuropeína nas folhas de oliveira, o que pode justificar o menor crescimento microbiano na carne dos frangos que receberam folhas de oliveira na dieta. Os compostos fenólicos das folhas de oliveira são os principais responsáveis pela sua ação bactericida/bacteriostática. A ação destes compostos é, sobretudo, exercida ao nível da membrana celular da bactéria, provocando danos estruturais e funcionais. As substâncias ativas das plantas são capazes de alterar a estrutura fosfolipídica da membrana celular, interrompendo o sistema enzimático, comprometendo o material genético da bactéria e formando compostos tóxicos, como o peróxido de hidrogênio (AFONSO, 2014; CIRQUEIRA, 2010). A ação positiva das folhas de oliveira in vivo também foi verificada em filés de peru (BOTSOGLOU et al., 2010) e em carne suína (PAIVA-MARTINS et al., 2013; BOTSOGLOU et al., 2012; PAIVA-MARTINS et al., 2009), e em todas as pesquisas o efeito positivo frente as bactérias foi atribuído a presença de compostos fenólicos e a oleuropeína.

4.0 Conclusão

A utilização de 10 g/kg de folhas de oliveira proporcionou menor taxa de mortalidade, e o uso de 5g/kg apresentou melhor conversão alimentar nos frangos. A incorporação de folhas de oliveira em ambas as quantidades inibiu o crescimento microbiano nas coxas e sobrecoxas armazenadas a 4°C durante 12 dias, onde o uso de 10g/kg demonstrou melhor capacidade inibitória para *Enterococcus* spp, Bactérias ácido lácticas, *Pseudomonas*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, Coliformes termotolerantes e fecais, enquanto a inibição de *Staphylococcus aureus*, Aeróbios Psicrotóxicos e mesófilos foi mais eficiente quando utilizou-se 5g/kg.

Referências

- Afonso, S.M. **Utilização de extratos de folhas de oliveira como agente antioxidante**. Instituto Politécnico de Bragança. 2014.
- Ahmed, A.M.; Rabii, N.S.; Garbaj, A.M.; Abolghait, S.K. Antibacterial effect of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract in raw peeled undeveined shrimp (*Penaeus semisulcatus*). **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v.2, p.53-56, 2014.
- Allen, C. D.; Russell, S. M.; Fletcher, D. L. The relationship of broiler breast meat color and pH to shelf life and odor development. **Poultry Science**, v.76, p.1042-1046, 1997.
- AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. Official methods of analysis of AOAC international. 18. ed. Gaithersburg: AOAC, 2003.
- Benavente-Garcia O., Castillo, J., Lorente J., Ortuno A. and Del Rio J.A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, v.68. p.457-462, 2000.
- Benedict, R.C.; Microbial attachment to meat surfaces. **Meat Conference proceedings**. v.41, p.1-6, 1988.
- Bisignano, G., Lagana, M. G., Trombetta, D., Arena, S., Nostro, A., Uccella, N. In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europea* L. **FEMS Microbiology Letters**, v.198, p.9-13, 2001.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. On the 'in vitro' antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.51, p.971-974, 1999.
- Bock, M., Derraik, J., Brennan, C., Biggs, J., Morgan, P., Hodgkinson, S., Hofman, P., Cutfield, W. Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. **PLoS One**. 2013.
- Botsoglou, E., Govaris, A., Ambrosiadis, I., Fletouris, D. Lipid and protein oxidation of α -linolenic acid-enriched pork during refrigerated storage as influenced by diet supplementation with olive leaves (*Olea Europea* L.) or α -tocopheryl acetate. **Meat Science**, v.92. p.525-532, 2012.
- Botsoglou, E., Govaris, A., Christaki, E., Botsoglou, N. Effect of dietary olive leaves and/or α -tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v.121, p.17-22, 2010.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº20, de 21 de julho de 1999. **Métodos Analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – sal e salmoura**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 9 set. Seção 1.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº12, de 10 de abril de 2001. **Metodologias Analíticas, Ingestão diária admissível e limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 abr. Seção 1.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. **Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 set. Seção 1, p. 14, Capítulo II.
- Cardoso S.M., Guyot S., Marnet N., Lopes-da-Silva J.A, Renard C.M.G.C. and Coimbra M.A. Characterization of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, p.21-32, 2005.
- Christaki, E.V; Bonos, E.M; Florou-Paneri, P.C. Comparative evaluation of dietary oregano, anise and olive leaves in laying Japanese quails. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.13, p.97-101, 2011.
- Cirqueira, M. Agentes antimicrobianos químicos e naturais. **Food Ingredients Brasil**. p.36-42, 2010.

- CMMEF. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4^o Ed. Washington, 2001.
- Delazari, I. Programas de segurança de alimentos na indústria de produtos avícolas. In: Conferência Apinco 2003 de Ciência e Tecnologia Avícolas. Campinas, Anais. **Campinas: FACTA**, p.123-126, 2003.
- Dominguez, S. A.; Schaffner, D. W. Development and validation of a mathematical model to describe the growth of *Pseudomonas* spp. in raw poultry stored under aerobic conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p.287-295, 2007.
- Faiza, I; Wahiba, K.; Nassira, G.; Chahrazed, B.; Atik, B.F. Antibacterial and antifungal Activities of olive (*Olea europaea* L.) from Algeria. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v.1, p.69-73, 2011.
- Farber, J. M.; Peterkin, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v.55, p.476-511, 1991.
- Franco, B. D. G. M.; Landgraf, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182 p.
- Gök, V.; Bor, Y.; Effect of olive leaf, blueberry and *Zizyphus jujuba* extracts on the quality and shelf life of meatball during storage. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.10, p.190-195, 2012.
- Gökmen, M.; Kara, R.; Akkaya, I.; Torlak, E.; Önen, A. Evaluation of antimicrobial activity in olive (*Olea europaea*) leaf extract. **American Journal of Microbiology**, v.5, p.37-40, 2014.
- Komaki, E., Yamaguchi, S., Maru.I., Kinoshita, M., Kakehi, K., Ohta, Y., Tsukata, Y. Identification of anti- α -amylase components from olive leaf extracts. **Food Science and Technology Research**, v.9, p.35-39, 2003.
- Kontogiani, V.; Gerathanasis, I. Phenolic compounds and antioxidante activity of olive leaf extracts. **Natural Product Research**, v.26, p.186-189, 2012.
- Lawson A. J, Linton D, Stanley R. J. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p.375-380, 1997.
- Lee-Huang, S., Zhang, L., Huang, P., Chang, Y., Huang P. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression. By HIV-1 infection and OLE treatment. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.307, p.1029-1037, 2003.
- Lindqvist, R.; Sylvén, S.; Vagsholm, I. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.155-170, 2002.
- Malik, N.S.A; Bradford, J.M. Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive (*Olea europaea* L.) leaves. **Journal of Food Agriculture and Environment** , v.6, p.8-13, 2008.
- Markin, D.; Duek, L.; Berdicevsky I. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. **Mycoses**. v.46, p.132–136. 2003.
- Mehyar, G. Effectiveness of trisodium phosphate, lactic acid and commercial antimicrobials against pathogenic bacteria on chicken skin. **Food Protection Trends**, v.25, p.351-362, 2005.
- Mellor, G. E.; Bentley, J. A.; Dykes, G. A. Evidence for a role of biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* in the spoilage of fresh aerobically stored chicken meat. **Food Microbiology**. v.28, p.1101- 1104, 2011.

- Miyagusku, L.; Chen, F.; Leitão, M.F.de F.; Baffa, O. Microbiological and sensory evaluation of the shelf-life of irradiated chicken breast meat. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.23, p.7-16, 2003.
- Muriana, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **Journal Food Protection**, v.59, p.54-63, 1996.
- Nascimento, F.C.A. **Aspectos socioeconômicos das doenças veiculadas pelos alimentos**. Disponível:<<http://nutricaoempauta.com.br/novo/40/2006>. Acesso em: 10 ago. 2011.
- Nascimento, G.M. **Utilização de produtos alternativos aos antibióticos moduladores de crescimento na produção de frango de corte**. Universidade Federal de Goiás.33f. 2013.
- Oliveira, A.L.; Pereira, M.T. Bueno, P.H.S.; Oliveira, R.B.P.; Pinto, F.C.; Correia, R.F.; Machado, M.M. Qualidade microbiológica da carne de frango irradiada em embalagem convencional e a vácuo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.1210-1217, 2009.
- Oliveira, W.F.; Cardoso, W.M.; Marques, L.C.L.; Salles, R.P.R.; Filho, J.L.C.A.; Teixeira, R.S.C.T.; Romão, J.M.; Lima, A.C.P. Use of diferente culture medias to enterobacteria isolation in feces samples from industrial broiler flocks in Ceará state, Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v.99, p.211-214, 2004.
- Paiva-Martins, F., Barbosa, S., Pinheiro, V., Mourão, J.L., & Outor-Monteiro, D. The effect of olive leaves supplementation on the feed digestibility, growth performances of pigs and quality of pork meat. **Meat Science**, v.82. p.438–443, 2009.
- Paiva-Martins, F., Ribeirinha, T., Silva, A., Gonçalves, R., Pinheiro, V., Mourão, J.L., Outor-Monteiro, D. Effects of the dietary incorporation of olive leaves on growth performance, digestibility, blood parameters and meat quality of growing pigs. **Society of Chemical Industry**, v.94. p.3023-3029, 2013.
- Pelisser, M. R. Detection of *Listeria* species in refrigerated chicken carcasses using Clearview TM and a modified conventional culture method. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.113-116, 2001.
- Pereira, A.P.; Ferreira, I.C.F.R.; Marcelino, F.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento, A.; Pereira, J.A. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Corbançosa) Leaves. **Molecules**, v.12, p.1153-1162, 2007.
- Ritter, R.; Bergmann, G. P. Eficácia do sistema de pré-resfriamento de frangos em tanques, sobre a redução da contaminação bacteriana de carcaças. **Higiene alimentar**, v.17, p.97-104, 2003.
- Ruiz-Barba, J. L., Garrido-Fernandez, A., & Jimenez-Diaz, R. Bactericidal action of oleuropein extracted from green olives against *Lactobacillus plantarum*. **Letters in Applied Microbiology**, v.12, p.65–68, 1991.
- Ruiz-Barba, J. L., Rio-Sanchez, R. M., Fedriani-Triso, C., Olias, J. M., Rios, J. L., & Jimenez-Diaz, R. Bactericidal effect of phenolic compounds from green olive against *L. plantarum*. **Systematic Applied Microbiology**, v.13, p.199–205, 1990.
- Ryser, E. T.; Marth, E. H. **Listeria, Listeriosis, and Food Safety**. New York: University of Wisconsin. 632 p. 1991.
- Sales, R. O., Porto, E. Disseminação bacteriana. Principais patógenos e higienização no abate de frangos: uma revisão. **Revista Científica de Produção Animal**. v.1, p.211-226, 1999.
- Silva Junior, E. A. S. **Manual de controle higiênico sanitário em alimentos**. 4.ed. São Paulo: Varela, 475 p. 2001.
- Silva, N.; Junqueira, V. C. A; Silveira, N. F. A. Taniwaki, M. H.; Santos, R. F. S.; Gomes, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Varela, 2007.

Standard Methods. (2010). (ISO 13720-1:2010).

Sudjana, A.N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T.V., Hammer, K.A. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.33, p.461–463, 2009.

UBABEF. **Brazilian Poultry Association, Annual Report**, 2012.

Villa, F.; Oliveira, A.F. Origem e expansão da oliveira na América Latina. In: Oliveira, A.F. **Oliveira no Brasil: tecnologias de produção**. Belo Horizonte: EPAMIG, cap. 1.p.21-28, 2012.

4.2 Quality of meat from chicken fed on olive leaves

Cristiane Marangoni ⁽¹⁾, Alexandre José Cichoski ⁽¹⁾ and Juliano Smanioto Barin ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Federal University of Santa Maria (UFSM), Department of Food Sciences, CEP:97105900, Bairro Camobi, Avenida Roraima n° 1000. Santa Maria, RS, Brazil. Email: eng.cristiane@gmail.com, cijoale@gmail.com, juliano@ufsm.br

Abstract

BACKGROUND: The influence of the dietary supplementation of olive leaves on chicken meat in terms of lipid oxidation, protein, physicochemical characteristics and microbiological growth were investigated. One group received a traditional diet (control) and the other two groups were given diets supplemented with 5 and 10 g of olive leaves per kg of feed. After slaughter, the meat from the thighs and drumsticks was collected and stored at -18 °C for 120 days.

RESULTS: The use of 5 g of olive leaves slowed the development of TBARS, the peroxide index and protein carbonyl. The meat from the chicken fed on olive leaves showed higher CRA and less exudate, a_w and moisture. Supplementation with 5 g of olive leaves reduced the growth of *Staphylococcus aureus* and aerobic psychrotrophic bacteria, whereas supplementation with 10 g of olive leaves reduced the growth of mesophilic aerobic bacteria, lactic acid, *Pseudomonas*, thermotolerant and total coliforms, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., and *Clostridium perfringens*.

CONCLUSION: These positive results can be attributed to the percentage of 15.0 (\pm 0.8) g.kg⁻¹ of oleuropein that are present in olive leaves and it is recommended that they are used in the diet of chicken in order to improve the quality of the meat.

Keywords: thighs and drumsticks, lipid oxidation, protein oxidation, microbiological stability, oleuropein.

Introduction

In 2011, the production of chicken meat in Brazil was 13,058 million tons, making Brazil the world's third largest producer, behind the United States and China. The domestic market consumes 69% of this figure and 3.9 million tons are shipped to more than 150 countries, making Brazil the world's largest exporter.⁵⁴

Chicken meat contains lipids, which are capable of undergoing autoxidative reactions, and due to the disruption of cellular membranes caused in the mechanical separation process chicken cuts facilitate the interaction of pro-oxidants with the unsaturated fatty acids present in the meat, resulting in the generation of free radicals and oxidative reactions. According to Govaris et al.²¹ in order to slow oxidation in the processing and storage stages of the raw material, or the cuts, it is often more effective to supplement the diet of the growing live animal than to directly add preservative after it is slaughtered. The meat may also contain pathogens such as *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella* spp. and *Yersinia* spp., which can cause damage to health and also food poisoning, as well as microorganisms associated with deterioration such as *Pseudomonas*.³⁸⁻³⁷

The importance of olive leaves and their potential use have been mentioned in a review by Erbay & Icier¹⁴. Their antioxidant and antimicrobial benefits have been reported in various in vitro studies^{24,34, 52,33,23} and in vivo studies^{39,7,8,13,40} involving turkeys, pigs, and rabbits.

Botsoglou et al.⁷ supplemented the diet of turkeys with 5 and 10 g of olive leaves/kg of feed and stored the meat at ± 4 °C for 12 days. The authors obtained significant delay ($P < 0.05$) in lipid oxidation, evaluated by TBARS, in the meat that received the addition of olive leaves compared to the control treatment. They also found a reduction in the number of lactic acid bacteria, psychotropic, mesophilic and enterobacterial colonies. This delay in lipid oxidation and microbial growth was attributed to the presence of various components of the leaves, which entered into the circulatory system and were distributed and retained in the tissues of the turkeys.

Paiva-Martins et al.³⁹ supplemented the diet of pigs with olive leaves in amounts of 5 to 10 g/kg feed. They then evaluated the cutlets and found values that were significantly ($P < 0.05$) lower in terms of peroxide content and conjugated dienes for the supplemented

treatments compared to the animals that received the standard diet. Botsoglou et al.⁸ also supplemented the diet of pigs with olive leaves in amounts of 5 to 10 g/kg feed. When they evaluated muscle stored at 4 °C for 9 days they found significant reductions in lipid oxidation in comparison with the treatment which received a standard diet. Paiva-Martins et al.⁴⁰ evaluated the effect of the incorporation of olive leaves in the diet of pigs on the quality of meat and they verified a reduction in the thickness of fat, as well as increased amounts of tocopherol. However, the values for conjugated dienes, pH and color of the meat of the animals fed with olive leaves were similar to those of the animals that received a traditional diet.

The present study was conducted to evaluate the physiochemical and microbiological quality of meat from Cobb chickens, which were fed with olive leaves at a percentage of 5 to 10 g per kg of feed for 42 days and then stored at -18 °C (± 1 °C) for 120 days.

Materials and Methods

Olive leaves

The olive leaves (*Olea europaea L.*) of the Ascolana variety were collected between January and March 2012 from a five-year old olive grove in Epagri Chapecó, Santa Catarina, Brazil. The leaves were dried at 45 °C in an oven with air circulation for 72 hours and then ground in a Willey-type mill with sieves of 1 mm. The experiment used the following three treatments: the first, T1 (control) received a traditional diet; the second, named T2, received a diet supplemented with 5 g of olive leaves per kg of feed; and the third, named T3, received a diet supplemented with 10 g of olive leaves per kg of feed.

The oleuropein content present in the olive leaves was assessed after drying according to the method proposed by Guimarães et al.²⁰ and the chromatographic conditions suggested by Quirantes-Piné et al.⁴⁶ The separation of oleuropein was performed using Agilent 1260 Infinity HPLC (Agilent Technologies, Germany) liquid chromatography with a diode array detector (DAD).

Animals and diets

This research used 2,520 female Cobb chickens which were reared in an agribusiness in the western part of the state of Santa Catarina. Twelve repetitions were performed for each treatment; the animals were housed randomly in 36 boxes with 70 animals per box.

After 42 days the animals were slaughtered in a refrigerated slaughterhouse and the thighs and drumsticks were collected for storage in polyethylene containers at -18 °C (± 1 °C) for 120 days during which the physicochemical and microbiological characteristics of the meat were monitored.

To perform the analyses, the frozen thighs and drumsticks were thawed in a refrigerator for 12 hours at temperature of 4-8 °C. After thawing, the meat was separated from the skin and bone for analysis.

Physicochemical analyses of the meat

The lipids were determined using the method of Bligh & Dyer ⁶, which consists of extracting the fat from the sample using chloroform.

The protein, moisture and the fixed mineral residue were determined according to the methodology described in the Normative Instruction 20 dated 21/7/1999 MAPA. ⁹

The pH was performed in the muscle with a Digimed (DM-20) potentiometer, using a penetration electrode.

The water activity was assessed by grinding the thigh and drumstick meat in a processor and the reading was performed using AQUALAB equipment, model 3TE at 15 °C.

The exudate was assessed by measuring the fluid exuding from the meat by applying the following formula:

$$\% \text{Exsudação} = \frac{WL \times 100}{TW} \text{ Where: WL = weight of liquid; TW = total weight}$$

The water holding capacity (WHC) was assessed according to the method described by Barbut ⁴ by homogenization and centrifugation; the retained sample was used to calculate the percentage of the sample solution.

To assess the extent of oxidation of the lipids, the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test was performed according to the method described by Wang et al. ⁵⁷

The peroxide index was evaluated following the method described by Lanara ³¹; this test evaluates the organic peroxides formed at the beginning of rancidity that act on potassium iodide and release iodine, which is titratable with sodium thiosulfate in the presence of starch.

The conjugated dienes were determined according to the methodology described by Recknagel.⁴⁸

The protein oxidation was determined by the method of Levine et al.³⁵ A blank sample was performed and then the readings were carried out using a spectrophotometer at 370 nm, zeroing with 2% SDS buffer.

The color of the thighs and drumsticks was determined using a calibrated Minolta CR400 colorimeter operating with illuminant D65 and 10 °C viewing angle, expressed in the CIELAB system with the values (L* a* and b*), where L* indicates lightness (ranging from 100% white to 0% black), a* (red-green component) and b* (yellow-blue component).

For the determination of the free fatty acids profile, the fat was initially extracted from the sample using chloroform, following the method of Bligh & Dyer.⁶ Aliquots were obtained of the extract, the chloroform was evaporated, and then saponification and esterification were performed. The lipids were subsequently recovered in hexane using the method described by Hartman & Lago.²²

Microbiological analyses of the meat

The *Clostridium perfringens* analysis was performed using TSC culture medium and deep pour plate sowing, with reading after 24 hours of incubation at 36 °C (± 1 °C), according to the methodology described by Normative Instruction 62 of August 26, 2003 of the Ministry of Agriculture.¹¹

The estimation of bacterial densities total coliforms it was made from the most probable number (MPN) method. The analyses of total coliforms, thermotolerant coliforms, *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, mesophilic aerobic bacteria, lactic acid bacteria, psychotropic aerobic bacteria, *Pseudomonas spp.*, *Campylobacter (jejuni, coli, lari)*, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* were performed by the AOAC¹ method.

Statistical analysis

The analyses were performed in triplicate and were subjected to analysis of variance (ANOVA) using a randomized complete block design. The means were compared by Tukey's test at 5% error probability using Statistica software - Stat Soft version 7.

Results and discussion

The oleuropein content found in the olive leaves was $15.0 (\pm 0.8) \text{ g.kg}^{-1}$ (CV of 5.1%, $n = 3$). This value was similar to that found by Paiva-Martins, et al.³⁹ who found $22.3 (\pm 0.18) \text{ g.kg}^{-1}$ of oleuropein in olive leaves, and Aytul³ who found 21.58 g.kg^{-1} of oleuropein in olive leaf extract. According to Aytul³ oleuropein prevents the formation of free radicals by its ability to chelate metals such as copper and iron, which catalyze reactions that generate free radicals, such as the oxidation of lipids. As a protective action, oleuropein may also neutralize radicals directly, providing hydroxyl groups.¹⁹ Pereira et al.⁴³ mention that oleuropein inhibits pathogens such as *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*.

The lipid content in the thighs and drumsticks are shown in Table 1. At the outset they ranged from 5.807 to 9.284, and from day 30 to day 120 they stabilized between 7.010 and 7.103, and then remained with no significant difference between the treatments. The protein values oscillated between 17.950 and 18.246, close to the values in Taco⁵³, which indicate values of 17.6% and 17.8% of protein for drumstick and chicken thigh meat, respectively. There was no significant difference between treatments during the 120 days. The values for fixed mineral residue ranged between 0.913 and 0.920 and also did not differ between the treatments during the studied period, indicating that the olive leaves had no influence on this parameter.

The moisture content in the three treatments decreased during the 120 days of storage from the first day of analysis. The meat from animals that consumed olive leaves showed percentages that were significantly ($P < 0.05$) lower compared to the control treatment. Considering that all the samples were stored under the same conditions in terms of packaging and temperature, it can be said that the higher moisture values for the control treatment made that treatment more conducive to microbial growth, because Pardi et al.⁴¹ indicated values of 65-74 as being favorable to microbial growth. Pino⁴⁴ assessed the oxidative stability of chicken and found moisture values which ranged from 68.07 to 70.17%; higher values than those in the present study.

The pH values for the frozen thighs and drumsticks started with values of 5.897; 5.840 and 5.820 for T1, T2 and T3, respectively, and after 60 days, the treatments had been influenced by the presence of olive leaves and T2 and T3 showed values significantly ($P < 0.05$) lower than T1. The high pH of T1 on days 60, 90 and 120 (5.987, 6.060 and 6.060), was similar to what was referred to in a study by Porto⁴⁵ and was related to bacterial

metabolism processes, which are more conducive to bacterial growth. Beraquet⁵ found that manually boned drumstick meat had a pH ranging from 5.8 to 6.2. Racanicci⁴⁷ found pH values of 6.17 for frozen chicken drumstick meat where the chickens had been fed on diets containing added fresh and oxidized poultry offal fat.

The a_w values for the treatments with olive leaves were lower and significantly different from the control during 120 days, which is indicative that the olive leaves had a positive influence on the a_w parameter because a lower amount of free water for physical, chemical and biological reactions makes foods less susceptible to deterioration.¹⁶

The loss of exudate in the chicken thighs and drumsticks was significantly higher for the treatment which received the traditional diet compared to the treatments with olive leaves from day 1 to day 120. The lower losses due to exudation in the treatments with olive leaves in the diet of the chickens is a positive factor in relation to the meat because, according to Jensen et al.²⁸ the loss of exudate is a major factor in the reduction of the quality of meat.

The water retention capacity (WRC) of the chicken thighs and drumsticks for the treatments T1, T2 and T3 started with percentages of 19.200; 19.670 and 20.310, and at day 120 these had reached 19.910; 20.010 and 20.657 respectively. These results indicate a WRC that was significantly ($P < 0.05$) higher for the treatments with added olive leaves in the diet in relation to the treatment which received a standard diet over 120 days of storage at $-18\text{ }^\circ\text{C}$. According to Huallanco²⁵ a high WRC corresponds to greater juiciness, and better palatability and sensory perception, with a consequent improvement in the quality of meat. Therefore, this factor indicates the positive effect of the ingestion of olive leaves on this parameter. Low WRC values indicate the loss of moisture and increases in the percentage of exudate in meat.⁵⁰ This relationship was observed in the present study, where the treatments with the addition of olive leaves in the diet had higher WRC values than the control, and consequently they had lower exudation values (Table 1).

The treatments with lower exudation values (T2 and T3) also recorded significantly lower values ($P < 0.05$) in terms of pH compared to T1. On day 1 these values were 5.897; 5.840 and 5.820 and at 120 days of storage they were 6.060, 5.933 and 5.953 for T1, T2 and T3, respectively. Vieira⁵⁵ evaluated chicken breast fillets and found increased loss due to exudation with decreasing pH, which was different from what was found in the present study. A decrease in pH causes the denaturation of proteins that bind the water in the meat, which

promotes the accumulation of moisture out of the cells, in the interstitial space. Protein denaturation caused by the lowering of pH did not occur in the present study, indicating that the olive leaves improved the WRC of the chicken thighs and drumsticks, even at a pH significantly lower than T1.

The number of TBARs for the chicken thighs and drumsticks which had received olive leaves was lower than for the control treatment (Table 2), demonstrating the ability to retard oxidative reactions. According to Kajdzoska et al.³⁰ these reactions are due to the high redox potential of phenolic compounds, which can act as reducing agents, donate hydrogen, and suppress singlet oxygen. The number of TBARs in the three treatments increased slightly after freezing. According to Pino⁴⁴ this possibly occurs because of dehydration caused by low temperatures, which results in a lower a_w , and which favors lipid deterioration. Racanicci⁴⁷ studied chicken drumsticks and also found an increase in TBARS values in the initial period of frozen storage, where the values ranged from 0.160 initially to 0.474 mg malonaldehyde/kg in the fifth month of storage. Verma & Sahoo⁵⁶ indicated concentrations of between 1 and 2 mg MDA/kg as the threshold values to detect rancidity. Chouliara et al.¹² determined that values of 3 mg of MDA/kg of meat were associated with oxidative rancidity. Considering these values, the chicken thighs and drumsticks in the present study were in excellent condition because they presented MDA values well below those mentioned by Verma & Sahoo⁵⁶ and Chouliara et al.¹² over a period of 120 days.

The freezing of the chicken thighs and drumsticks resulted in a significant reduction in the peroxide value of the three treatments when the first day of analysis was compared to the other days of monitoring. This indicated that temperature had a positive effect on the peroxides. The treatments with the addition of olive leaves in the diet had significantly lower ($P < 0.05$) peroxide values than T1 from day 30 to day 120, indicating that the addition of olive leaves via the diet fed to the chickens was capable of delaying the start of the oxidation process. Peroxide values above 5 mEq/kg fat indicate undesirable sensory characteristics that are noticeable on the palate; values above 10 mEq make a product unsuitable for consumption, characterizing acceleration in the onset of rancidity.¹⁵ The peroxide values in the present study were lower than those cited by Feddern et al.¹⁵ indicating that the lipid oxidation that occurred in the chicken thighs and drumsticks caused no perceptible change in the taste of the meat.

The analysis of conjugated dienes showed no significant difference ($P > 0.05$) between treatments, indicating that the olive leaves had no effect on this parameter. Paiva-Martins et al.³⁹ evaluated the conjugated dienes content in pigs whose diet was supplemented with 5% and 10% olive leaves and they observed that after 8 days of storage at 4 °C the olive leaves had an influence on the formation of conjugated dienes because the pigs who received no olive leaves (control) showed values six times higher than the other treatments.

The protein oxidation of the thighs and drumsticks was measured by protein carbonyls and it fluctuated during the 120 days of storage. From day 90 to day 120 the values reduced for the three treatments. According to Lund et al.³⁶ this may be related to the amount of secondary products of lipid oxidation (TBARS) that are formed, because the formation of carbonyl compounds reduces when the compounds of lipid oxidation increase. Thus, there is a relationship between the secondary products of oxidation and the formation of carbonyl compounds. The consumption of olive leaves had a positive effect on delaying the formation of carbonyl compounds, but only in the case of the treatment with 10 g olive leaves/kg feed from day 90 to day 120. Soyer et al.⁵¹ studied chicken breast meat supplemented with a standard diet, which was stored for 6 months at -18 °C. After 120 days of storage they found values of 1.5 nmol carbonyl/mg protein, with an increase in the amount of carbonylated protein over time, reaching a maximum value of 1.9 nmol carbonyl/mg protein at 180 days. This indicated that the time of storage under freezing resulted in increased protein oxidation of the meat.

Regarding color, the thighs and drumsticks from treatment T2 showed higher lightness values at 30, 60 and 120 days compared to T1 and T3 (Table 3). Amador² analyzed the meat from thighs and drumsticks from chickens fed on diets containing different natural antioxidants and found L^* values ranging from 46.63 to 48.58, and pH from 5.97 to 6.16. Comparing the results of the present study with those found by Amador², there was a similarity in the pH values, but higher lightness values in the present study. However, it is not possible to say that the olive leaves given to the chickens influenced the L^* values because the treatments were not significantly different ($P < 0.05$) between each other. Le Bihan-Duval et al.³² observed that the highest lightness values were associated with the greatest losses of water by exudation. This did not occur in relation to the frozen thighs and drumsticks in the present study. However, when the lightness values and the exudation values for the thighs and drumsticks were compared on day 1 of analysis the values were as follows, L^* (57.58; 56.15;

56.69/54.56; 52.78; 54.40) and exudation (1.087, 1.103 and 0.830) for T1, T2 and T3, respectively. Higher lightness (L^*) values and greater exudate losses were observed for the control treatment, which was in accordance with the findings of Le Bihan-Duval et al.³² The L^* , a^* and b^* values changed during the 120 days of analysis but there was no trend between the samples. This result indicates that the olive leaves added via the chickens' diet did not promote color changes in the thighs and drumsticks of T3 and T2 in relation to the treatment that received a conventional diet (T1).

The free fatty acids profile (Table 4) indicated no significant difference ($P > 0.05$) between the treatments. During the 120 days of storage the fatty acids found in the chicken thighs and drumsticks did not suffer a variation in percentages, demonstrating that lowering the temperature and the ingestion of olive leaves had no significant effect on this parameter.

The counts for mesophilic aerobic bacteria, lactic acid, psychotropic bacteria and *pseudomonas* showed little fluctuation during the 120 days (Figure 2). Freezing had more influences on the mesophilic aerobic bacteria and *pseudomonas*, reducing the numbers of colonies of these between day 1 and day 30 of analysis. When it is frozen, water is not available, and most microorganisms cannot grow.⁴

For the treatments which received olive leaves, the evaluation of the number of mesophilic aerobic colonies showed lower scores than the control on day 1 (6; 4; 3 \log_{10} CFU/g) and at day 120 (2.88; 1.71; 1.34 \log_{10} CFU/g) for the treatments T1, T2 and T3, respectively (Figure 2). There was significant difference ($P < 0.05$) during the 120 days between T2 and T3, indicating that the ingestion of 10 g/kg of olive leaves had a better effect on the growth of mesophilic aerobic bacteria. According to Jay²⁷ the number of colonies of mesophilic aerobic bacteria provides an estimate of the total microbial population, and a high number indicates low quality and reduced shelf life of a food product. According to Ritter & Bergmann⁴⁹ the number of mesophilic bacteria above 6 \log_{10} CFU/g indicates unfit hygienic/sanitary conditions for chicken meat. The thighs and drumsticks of treatment T1 on day 1 of analysis showed a number of colonies of mesophilic bacteria, equal to the ideal limit of 6 \log_{10} CFU/g, and very close to the limit of useful life (7 \log_{10} CFU/g)²⁶. In relation to treatment T1, the treatments T2 and T3 respectively presented numbers of colonies of mesophilic bacteria that were 2 and 3 log cycles less on day 1, and 1.16 and 1.54 log cycles less on day 120 of storage.

The number of colonies of lactic acid bacteria in the treatments with olive leaves ranged from 1.51 to 1.71 log₁₀ CFU/g for T2 and from 1.37 to 1.34 log₁₀ CFU/g for T3 (Figure 2). During the 120 days of storage the number of colonies in the chicken meat that had ingested olive leaves was significantly lower ($P < 0.05$) than that found in T1 (2.36 to 2.88 log₁₀ CFU/g). The ingestion of 10 g of olive leaves resulted in meat with fewer colonies compared to T2, demonstrating that this concentration of olive leaves had a better effect in relation to lactic acid bacteria.

The control meat showed a number of colonies of psychotropic bacteria that were significantly higher ($P < 0.05$) than the treatments with olive leaves on day 1 of analysis (3; 2 and 2.8 log₁₀ CFU/g for T1, T2 and T3, respectively) (Figure 2). The ingestion of 5 to 10 g olive leaves/kg of feed showed an antimicrobial effect in relation to psychotropic bacteria, because the numbers of colonies in treatments T2 and T3 was 1 and 0.89 log cycles lower than the number of colonies in T1 at day 120 of storage. Brazilian legislation provides no standard for this microorganism, consequently this study considered the limit of 6-7 log₁₀ CFU/g, which was determined by the ICMSF²⁶ to define the termination of useful life because above this number of colonies, sensory changes are detected due to the metabolites that result from microbial growth. Considering these microbiological values (6-7 log₁₀ CFU/g), the meat from the three treatments was suitable for consumption from day 1 to day 120 of storage. Galarz¹⁸ analyzed chicken breast fillets with no antioxidant that were stored for 20 days at -18 °C and found figures of 4 log₁₀ CFU/g for the number of colonies of psychotropic bacteria. In the present study, treatments T2 and T3 showed 1.54 and 1.65 log₁₀ CFU/g, respectively after 120 days of storage at -18 °C, indicating that the ingestion of olive leaves by the chickens was effective in controlling psychotropic bacteria, because even after more than 100 days of storage, the number of colonies of bacteria psychotropic was fewer than that found in the study by Galarz¹⁸.

According to Johnson²⁹, bacteria of the *Pseudomonas* genus are capable of decaying protein in food kept at low temperatures. Frazier & Westhoff¹⁷ also highlight the ability of some species of *Pseudomonas* to grow at low temperatures, and to possess proteolytic and lipolytic activity. As shown in Figure 2, the number of colonies of *Pseudomonas* colonies evaluated in the present reduced after 30 days due to freezing, which demonstrates that cold provides a barrier to the development of this genus of bacteria. Treatments T2 and T3 (1.43 and 1.17 log₁₀ CFU/g respectively) had significantly lower ($P < 0.05$) numbers of colonies of

pseudomonas that were found in T1 (2.05 log₁₀ CFU/g) at day 120 day of assessment, and also every previous day that was analyzed, showing the positive effect of olive leaves in relation to this microorganism.

The number of colonies of total coliforms (35 °C), which is indicative of the degree of contamination in the environmental in which the chicken thighs and drumsticks were obtained²⁷ can be seen in Figure 3. On day 1 of assessment the number of colonies for treatments T1, T2 and T3 were 2.64; 2.05 and 1.93 log₁₀ UFC/g respectively, and on day 120 they were 2.38; 1.61 and 1.21 log₁₀ UFC/g, respectively. The counts fluctuated over the 120 days, but in all the analyses T2 and T3 were significantly lower (P <0.05) than T1, indicating the positive effect of the ingestion of olive leaves in relation to the growth of coliforms.

Resolution No. 12/2001 of ANVISA¹⁰ establishes a maximum limit for coliforms at 45 °C or thermotolerant coliforms in frozen poultry (whole carcasses, fractions or cuts) of 10⁴ MPN/g (log 5.0 MPN/g). In the present study, treatment T1 was found to be unfit at day 120, reaching values of 504 log₁₀ CFU/g, while T2 (2.43 log₁₀ CFU/g) and T3 (2.08 log₁₀ CFU/g) presented a number of colonies below the limit allowed by Resolution No. 12/2001. These results demonstrate the positive effect of the ingestion of 5 and 10 g/kg of olive leaves in the inhibition of coliforms at 45 °C in the chicken thighs and drumsticks. On day 120 treatments T2 and T3 respectively presented log cycles 2.61 and 2.96 lower than T1, resulting in significant difference (P <0.05) between the treatments (Figure 3).

In relation to *Escherichia coli*, treatments T2 and T3 (1.26 and 1.12 log₁₀ CFU/g, respectively) showed significant decreases (P <0.05) for the counts on day 120 compared to T1 (1.93 log₁₀ CFU/g), showing that the ingestion of the two concentrations of olive leaves had an inhibitory effect, and that the use of 10g/kg of feed was most effective against this microorganism.

The meat from the chicken that received olive leaves in their diet (T2 and T3), showed an antimicrobial effect in relation to the *Enterococcus* spp. genus during the period studied (Figure 3). Due to this, the number of colonies observed in treatments T2 and T3 on all the days of assessment was lower than those found for T1, showing significant difference (P <0.05). Treatment T3 had a better inhibitory effect than T2 in relation to the *Enterococcus* spp. genus during the 120 days.

The use of 10 g/kg of olive leaves in the diet of the chickens provided a better inhibitory effect than the use of 5 g/kg in relation to *Clostridium perfringens*, but both concentrations showed inhibitory capacity compared to T1 (Figure 3). On day 120, the chicken thighs and drumsticks of treatments T2 and T3 (1.74 and 1.54 log₁₀ CFU/g, respectively) showed a respective reduction of 0.39 and 0.59 log cycles compared to T1 (2.13 log₁₀ CFU/g).

Brazilian legislation states that chilled or frozen raw meat products can contain up to 5x10³ CFU/g of coagulase-positive *Staphylococcus* per sample.¹⁰ However, the legislation does not cover the *Staphylococcus* genus in chilled or frozen poultry meat that is *in natura* (whole carcasses, fractions or cuts). Treatment T1 showed the highest number of colonies of *Staphylococcus aureus* from day 1 (2; 0 and 1 log₁₀ CFU/g) until day 120 (3.57; 1.94 and 1.98 log₁₀ CFU/g for T1, T2 and T3, respectively). Because Brazilian legislation does not stipulate a tolerance limit for *Staphylococcus aureus* in cuts of meat, we used the general threshold for meat products of 3.69 log₁₀ CFU/g.¹⁰ Thus, treatment T1 (3.57 log₁₀ CFU/g) came close to the legal limit on day 120, while the number of colonies of *Staphylococcus aureus* in T2 (1.94 log₁₀ CFU/g) and T3 (1.98 log₁₀ CFU/g), also on day 120, were much lower than 3.69 log₁₀ CFU/g.¹⁰ The olive leaves showed a positive effect in relation to *Staphylococcus aureus* because treatments T2 and T3 had 1.63 and 1.67 less log cycles, respectively, in comparison with T1 on day 120. *Staphylococcus* which does not produce coagulase can also produce enterotoxin, and therefore if it is present in food it can pose health risks to consumers.⁴² Although the ingestion of olive reduced the number of bacteria counts in the samples it is not possible to state that this was efficient in controlling *Staphylococcus* because this microorganism was present. The latter can cause health risks to consumers even when present in low concentrations because it can produce toxin.

The three treatments of chicken thighs and drumsticks that were stored frozen did not contain the presence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Yersinia* and *Streptococcus*.

Conclusion

The ingestion of olive leaves showed a positive influence in relation to protein and lipid oxidation in chicken meat; it reduced losses due to exudation, moisture content and a_w, and it increased the WRC of the meat. The profile of free fatty acids and the color of the thighs and drumsticks did not change significantly as a result of the ingestion of olive leaves.

Both the concentrations of olive leaves that were used showed inhibitory capacity in relation to deteriorating microorganisms and pathogens. The 10 g concentration of olive leaves was more effective regarding mesophilic aerobic bacteria, lactic acid, *pseudomonas*, total and thermotolerant coliforms, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., and *Clostridium perfringens*. The 5 g concentration of olive leaves was more effective regarding the inhibition of *Staphylococcus aureus* and aerobic psychotropic bacteria.

References

1. AOAC Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis of AOAC international*. 18. Ed. Gaithersburg: AOAC International (2003).
2. Amador, S.A. *Aspectos físicos da carne do peito, da coxa e da sobrecoxa de frango alimentados com dietas contendo antioxidantes naturais*. Universidade de Brasília: Brasília. 40f. (2013).
3. Aytul, K.K. *Antimicrobial and antioxidante activities of olive leaf extract and its food applications*. Master of Science: Izmir. 102f (2010).
4. Barbut, S. Estimates and detection of the PSE problem in young turkey breast meat. *Canadian Journal of Animal Science* **76**:455-457 (1996).
5. Beraquet, N.J. 2000. Carne mecanicamente separada de aves. Campinas: ITAL. 92p.
6. Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A raphid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiology* **37**:911-917 (1959).
7. Botsoglou, E. Govaris, A. Christaki, E. & Botsoglou, N. Effect of dietary olive leaves and/or α -tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. *Food Chemistry* **121**:17-22 (2010).
8. Botsoglou, E., Govaris, A., Ambrosiadis, I., Fletouris, D. Lipid and protein oxidation of α -linolenic acid-enriched pork during refrigerated storage as influenced by diet supplementation with olive leaves (*Olea Europea* L.) or α -tocopheryl acetate. *Meat Science*. **92**:525-532 (2012).
9. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria da Defesa Agropecuária, Instrução Normativa n°20, de 21 de julho de 1999. *Métodos Analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – sal e salmoura*. Diário Oficial da União: Brasília (1999).
10. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria da Defesa Agropecuária, Instrução Normativa n°12, de 10 de abril de 2001. *Regulamento Técnico Mercosul “Metodologias Analíticas, Ingestão diária admissível e limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal”*. Diário Oficial da União: Brasília (2001).
11. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria da Defesa Agropecuária, Instrução Normativa n°62, de 26 de agosto de 2003. *Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água*. Diário Oficial da União: Brasília (2003).
12. Chouliara, E.; Badeka, A.; Savvaidis, L.; Kontominas, M. G. Combined effect of irradiation and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of chicken breast meat: Microbiological, chemical and sensory changes. *European Food Research and Technology* **226**:877-888 (2008).
13. Dal Bosco, A.; Mourvaki, E.; Cardinali, R.; Servili, M.; Sebastiani, B.; Ruggeri, S.; Mattioli, S.; Taticchi, A. Esposto, S.; Castellini, C. Effect of dietary supplementation

- with olive pomaces on the performance and meat quality of growing rabbits. *Meat Science* **92**: 783-788 (2012).
14. Erbay, Z.; Icier, F. The importance and potential uses of olive leaves. *Food reviews international* **26**:319-334 (2010).
 15. Feddern, V. Kupski, L. Cipolatti, E.P.; Giacobbo, G. Mendes, G.L.; Badiale-Furlong E. Souza-Soares, L.A. Physico-chemical composition, fractionated glycerides and fatty acid profile of chicken skin fat. *European Journal Lipid Science Technology* **112**:1277-1284 (2010).
 16. Filho, A.B.M, & Vasconcelos, M.A.S. Química de alimentos. Recife: UFRPE. 78p. (2011).
 17. Frazier, W.C.; Westhoff, D.C. *Microbiologia de los alimentos*, 4.ed. Editorial Acribia, Zaragoza, 681p (1993).
 18. Galarz, L.A. *Estimativa da vida útil em peito de frango em diferentes temperaturas de armazenamento*. 146f. Universidade Federal do Rio Grande (2008).
 19. Galli, C.; Visioli, F. Antioxidant and Other Activities of Phenolics in Olive/Olive Oil, Typical Components of the Mediterranean Diet. *Lipids* **34**:23-26. (1999).
 20. Guimarães, R.; Barros, L.; Dueñas, M.; Calhela, R. C.; Carvalho, A. M.; Santos-Buelga, C.; Queiroz, M. J. R.; Ferreira, I. C. F. R. Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild Roman chamomile: A comparison between the herb and its preparations. *Food Chemistry* **136**:718-725 (2013).
 21. Govaris, A., E. Botsoglou, A. Moulas and N. Botsoglou. Effect of dietary olive leaves and rosemary on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast during refrigerated storage. *S. Afr. J. Anim. Sci.* **40**:154–155 (2010).
 22. Hartman, L.; Lago, B. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract* **22**:475-477 (1973).
 23. Hayes, J.E.; Allen, P.; Bruton, N.; O’Grady, M.N.; Kerry, J.P. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food chemistry* **126**:948-955 (2011).
 24. Hayes, J.E.; Stepanyan, V. Allen, P. O’Grady, M.N.; O’Brien, N.M.; Kerry, J.P. The effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on lipid oxidation and oxymyoglobin oxidation in bovine and porcine muscle model systems. *Meat science* **83**: 201-208 (2009).
 25. Huallanco, M.B.A. *Aplicação de um sistema de classificação de carcaças e cortes e efeito pós abate da qualidade de cortes de frango criados no sistema alternativo*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz: Piracicaba, 82f (2004).
 26. ICMSF. *International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications*. Toronto: University of Toronto **2**:181-186 (1986).
 27. Jay, J. M. 2005. *Microbiologia de alimentos*. (6th. Ed.). Porto Alegre: Artmed.
 28. Jensen, C.; Lauridsen, C; Bertelsen, G. Dietary vitamin E: quality and storage stability of pork and poultry. *Trends Food Science Technology* **9**:62-72 (1998).
 29. Johnson, E.A. Infrequent microbial infections. In: CLIVER, D.O. Foodborne diseases. Academic Press: San Diego, **19**: 260-275 (1990).
 30. Kajdzanoska, M.; Petreska, J.; Stefova, M.J. Comparison of Different Extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**:5272-5278 (2011).
 31. Lanara. *Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes*. II – Métodos físico químicos. Brasília, Ministério da Agricultura (1981).

32. LE Bihan-Duval, E. Millet, N. & Remignon H. Broiler meat quality: effect of selection for increased carcass quality and estimates of genetic parameters. *Poultry Science, Savoy* **78**:822-826 (1999).
33. Lee, O.H.; Lee, B.Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics on *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource technology* **101**:3751-3754 2010.
34. Lee, O.H.; Lee, B.Y.; Lee, J. Lee, H.B.; Son, J.Y.; Park; C.S.; Shetty, K.; Kim, Y.C. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresource technology* **100**: 6107-6113 (2009).
35. Levine R. L., Garland D., Oliver C. N., Amici A., Climent I., Lenz A. G., Ahn B. W., Shaltiel S., Stadtman E. R. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* **186**:464-478 (1990).
36. Lund, M. N, Heinonem, M., Baron, C.P., Estévez, M. Protein oxidation in muscle foods: A review. *Mol. Nutr. Food Res* **55**:83-95 (2011).
37. Oliveira, A.L.; Pereira, M.T. Bueno, P.H.S.; Oliveira, R.B.P.; Pinto, F.C.; Correia, R.F.; Machado, M.M. Qualidade microbiológica da carne de frango irradiada em embalagem convencional e a vácuo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* **61**:1210-1217 (2009).
38. Oliveira, W.F.; Cardoso, W.M.; Marques, L.C.L.; Salles, R.P.R.; Filho, J.L.C.A.; Teixeira, R.S.C.T.; Romão, J.M.; Lima, A.C.P. Use of diferente culture medias to enterobacteria isolation in feces samples from industrial broiler flocks in Ceará state, Brasil. *RPCV*. **99**:211-214 (2004).
39. Paiva-Martins, F., Barbosa, S., Pinheiro, V., Mourão, J.L., & Outor-Monteiro, D. The effect of olive leaves supplementation on the feed digestibility, growth performances of pigs and quality of pork meat. *Meat Science* **82**:438–443 (2009).
40. Paiva-Martins, F, Ribeirinha, T, Silva, A, Gonçalves, R, Pinheiro, V, Mourão, J.L, Outor-Monteiro, D. Effects of the dietary incorporation of olive leaves on growth performance, digestibility, blood parameters and meat quality of growing pigs. *J Sci Food Agric* **94**:3023-3029 (2014).
41. Pardi, M.C.; Santos, I.F.; Souza, E.R.; Parde, H.S. *Ciência e tecnologia da carne*. 2º Ed. V.1. Goiânia, 624p (2005).
42. Pereira, K.S.; Pereira, J.L. Estafilococos coagulase negativa: potenciais patógenos em alimentos. *Higiene Alimentar* **19**: 32-34 (2005).
43. Pereira, A.P.; Ferreira, I.C.F.R.; Marcelino, F.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento, A.; Pereira, J.A. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Corbançosa) Leaves. *Molecules* **12**:1153-1162 (2007).
44. Pino, L.M. *Estabilidade oxidativa da carne de frangos alimentados com diferentes fontes lipídicas, armazenada sob congelamento*. São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 72f (2005).
45. Porto, E. Qualidade da carne: microbiologia de carnes Ed: Varela São Paulo-SP p.101-131 (2006).
46. Quirantes-Piné, R.; Lozano-Sánchez, J.; Herrero, M.; Ibáñez, E.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. HPLC-ESI-QTOF-MS as a powerful analytical tool for characterising phenolic compounds in olive-leaf extracts. *Phytochemical analysis* **24**:213-223 (2013).
47. Racanicci, A.M.C. O efeito do uso do óleo de vísceras de aves oxidado no desempenho de frangos de corte e na estabilidade oxidativa da carne da sobrecoxa. Piracicaba, 80p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. (2004).

48. Recknagel, R. O.; Glende Jr., E. A. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods Enzymol* **105**:331-337 (1984).
49. Ritter, R., & Bergmann, G. P. Eficácia do sistema de pré-resfriamento de frangos em tanques, sobre a redução da contaminação bacteriana de carcaças. *Higiene alimentar* **17**:97-104 (2003).
50. Roça, R.O. *Composição química da carne*. UNESP, Campus de Botucatu, 12p.1999.
51. Soyer, A., Özap, B., Dalmis, Ü., Bilgin, V. Effects of freezing temperature and duration of frozen storage on lipid and protein oxidation in chicken meat. *Food Chemistry* **120**:1025-1030 (2010).
52. Sudjana, A.N.; D'orazio, C.; Ryan, V.; Rasool, N.; NG, J.; Islam, N.; Riley, T.V.; Hammer, K.A. Antimicrobial activity of comercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International jornal of antimicrobial agentes* **33**:461-463 (2009).
53. Taco. Tabela Brasileira de composição de alimentos. 2011. Campinas. Unicamp. 161p.
54. Ubabef. União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual 2010/2011. Disponível em: <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em: 06 de jan.2012.
55. Vieira, E.T.T. *A influencia do processo de congelamento na qualidade do peito de frango*. URI: Campus Erechim. 119f (2007).
56. Verma, S.P.; Sahoo, J. Improvement in the quality of ground chevon during refrigerated storage by tocoferol acetate preblending. *Meat Science* **56**:403-413 (2000).
57. Wang, B., Pace, R.D., Dessai, A.P., Bovell-Benjamin, A., & Phillips, B. Modified Extraction Method for Determining 2-Thiobarbituric Acid Values in Meat with Increased Specificity and Simplicity. *Journal of food Science* **67**:2833-2836 (2002).

Table 1 - Mean values lipid, protein, moisture, fixed mineral residue, pH, aw, exudation and WHC thighs and drumsticks storage frozen at -18°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) for 120 days.

Parameters		Storage time (Days)				
		1	30	60	90	120
Lipid (g kg^{-1})	T1	6,836 ^b	7,043 ^a	7,010 ^a	7,040 ^a	7,060 ^a
	T2	9,284 ^a	7,103 ^a	7,100 ^a	7,050 ^a	7,013 ^a
	T3	5,807 ^b	7,026 ^a	7,083 ^a	7,076 ^a	7,060 ^a
Protein (g kg^{-1})	T1	18,070 ^a	18,030 ^a	18,023 ^a	17,950 ^a	17,986 ^a
	T2	18,050 ^a	18,246 ^a	18,076 ^a	18,000 ^a	18,043 ^a
	T3	18,011 ^a	18,060 ^a	18,046 ^a	17,980 ^a	18,043 ^a
Moisture (%)	T1	69,473 ^a	69,960 ^a	68,960 ^a	67,600 ^a	66,900 ^a
	T2	67,750 ^a	67,767 ^c	67,700 ^b	66,267 ^b	65,233 ^b
	T3	68,267 ^a	68,700 ^b	68,100 ^b	66,617 ^b	65,266 ^b
Fixed mineral residue (%)	T1	0,917 ^a	0,910 ^a	0,910 ^a	0,913 ^a	0,913 ^a
	T2	0,920 ^a	0,915 ^a	0,917 ^a	0,915 ^a	0,918 ^a
	T3	0,927 ^a	0,915 ^a	0,913 ^a	0,913 ^a	0,910 ^a
pH	T1	5,897 ^a	5,917 ^a	5,987 ^a	6,060 ^a	6,060 ^a
	T2	5,840 ^a	5,890 ^a	5,910 ^b	5,943 ^b	5,933 ^b
	T3	5,820 ^b	5,807 ^b	5,917 ^b	5,930 ^b	5,953 ^b
aw	T1	0,995 ^a	0,995 ^a	0,994 ^a	0,993 ^a	0,993 ^a
	T2	0,994 ^b	0,993 ^b	0,992 ^b	0,991 ^b	0,991 ^b
	T3	0,994 ^b	0,994 ^b	0,993 ^b	0,992 ^b	0,992 ^b
Exudation (%)	T1	1,087 ^a	1,087 ^a	1,115 ^a	1,258 ^a	1,430 ^a
	T2	1,103 ^a	0,960 ^b	0,981 ^b	1,077 ^b	1,070 ^b
	T3	0,830 ^b	0,783 ^c	0,813 ^c	0,826 ^c	0,840 ^c
WHC (%)	T1	19,200 ^b	18,903 ^c	19,467 ^c	19,857 ^b	19,910 ^b
	T2	19,670 ^b	19,443 ^b	19,723 ^b	19,973 ^b	20,010 ^b
	T3	20,310 ^a	19,917 ^a	20,233 ^a	20,543 ^a	20,657 ^a

a, b, c are analyzed vertically between the three treatments in the same range. Different letters show significant differences ($P < 0,05$) by Tukey test. (T1) control diet, (T2) diet supplemented with 5g olive leaves/kg feed, (T3) diet supplemented with 10g olive leaves/kg feed.

Table 2 - Mean values TBARS, Peroxide value, Conjugated diene, and Protein carbonyls thighs and drumsticks storage frozen at -18°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) for 120 days.

Parameters		Storage time (Days)				
		1	30	60	90	120
TBARS (MDA equivalents, $\mu\text{g}/\text{Kg}$)	T1	0,059 ^a ($\pm 0,009$)	0,150 ^a ($\pm 0,065$)	0,075 ^a ($\pm 0,032$)	0,082 ^a ($\pm 0,024$)	0,177 ^a ($\pm 0,012$)
	T2	0,045 ^a ($\pm 0,011$)	0,030 ^b ($\pm 0,018$)	0,059 ^a ($\pm 0,034$)	0,079 ^a ($\pm 0,008$)	0,155 ^{a,b} ($\pm 0,015$)
	T3	0,089 ^a ($\pm 0,054$)	0,087 ^b ($\pm 0,081$)	0,065 ^a ($\pm 0,025$)	0,085 ^a ($\pm 0,018$)	0,125 ^b ($\pm 0,023$)
Peroxide value (mEq peroxide/kg)	T1	0,179 ^a ($\pm 0,000$)	0,000994 ^a ($\pm 0,002$)	0,001391 ^a ($\pm 0,002$)	0,000259 ^a ($\pm 0,000$)	0,001640 ^a ($\pm 0,003$)
	T2	0,147 ^a ($\pm 0,000$)	0,000003 ^b ($\pm 0,000$)	0,000009 ^b ($\pm 0,000$)	0,000001 ^b ($\pm 0,000$)	0,000013 ^b ($\pm 0,000$)
	T3	0,349 ^a ($\pm 0,000$)	0,000010 ^b ($\pm 0,000$)	0,000008 ^b ($\pm 0,000$)	0,000001 ^b ($\pm 0,000$)	0,000011 ^b ($\pm 0,000$)
Conjugated diene (abs./mg lip./ml cicloh)	T1	0,259 ^a ($\pm 0,020$)	0,205 ^a ($\pm 0,126$)	0,194 ^a ($\pm 0,021$)	0,241 ^a ($\pm 0,065$)	0,154 ^a ($\pm 0,010$)
	T2	0,251 ^a ($\pm 0,018$)	0,228 ^a ($\pm 0,022$)	0,218 ^a ($\pm 0,031$)	0,254 ^a ($\pm 0,073$)	0,174 ^a ($\pm 0,008$)
	T3	0,311 ^a ($\pm 0,063$)	0,245 ^a ($\pm 0,042$)	0,198 ^a ($\pm 0,009$)	0,280 ^a ($\pm 0,027$)	0,160 ^a ($\pm 0,019$)
Protein Carbonyls (nmol/mg protein)	T1	1,235 ^a ($\pm 0,414$)	0,099 ^a ($\pm 0,015$)	0,178 ^a ($\pm 0,067$)	0,115 ^a ($\pm 0,018$)	0,070 ^a ($\pm 0,005$)
	T2	1,015 ^a ($\pm 0,361$)	0,082 ^a ($\pm 0,020$)	0,159 ^a ($\pm 0,021$)	0,091 ^a ($\pm 0,012$)	0,089 ^a ($\pm 0,011$)
	T3	0,973 ^a ($\pm 0,246$)	0,064 ^a ($\pm 0,003$)	0,183 ^b ($\pm 0,002$)	0,077 ^b ($\pm 0,002$)	0,050 ^b ($\pm 0,006$)

a, b, c are analyzed vertically between the three treatments in the same range. Different letters show significant differences ($P < 0,05$) by Tukey test. The standard deviation is in parentheses. (T1) control diet, (T2) diet supplemented with 5g olive leaves/kg feed, (T3) diet supplemented with 10g olive leaves/kg feed.

Table 3 - Mean values Color (L*, a*, b*) thighs and drumsticks storage frozen at -18°C (±1°C) for 120 days.

Parameter	T1		T2		T3		
	thighs						
L*	1	57,58 ^a	(±2,000)	56,15 ^a	(±1,480)	56,69 ^a	(±2,440)
	30	76,537 ^b	(±0,862)	82,863 ^a	(±0,356)	80,483 ^a	(±1,850)
	60	59,203 ^{ab}	(±3,806)	61,027 ^a	(±0,178)	54,910 ^b	(±1,464)
	90	63,250 ^a	(±1,403)	54,813 ^c	(±1,155)	58,820 ^b	(±0,375)
	120	55,557 ^a	(±2,187)	58,707 ^a	(±1,525)	56,650 ^a	(±1,535)
a*	1	17,31 ^a	(±1,700)	13,45 ^a	(±1,360)	14,37 ^a	(±2,120)
	30	7,217 ^a	(±1,089)	4,163 ^b	(±0,901)	7,440 ^a	(±0,246)
	60	16,413 ^a	(±3,446)	14,240 ^a	(±0,587)	18,843 ^a	(±0,833)
	90	12,693 ^b	(±0,741)	18,700 ^a	(±0,652)	14,137 ^b	(±1,664)
	120	17,040 ^a	(±0,851)	16,653 ^a	(±0,868)	17,133 ^a	(±0,484)
b*	1	8,57 ^b	(±1,430)	15,66 ^a	(±3,280)	14,24 ^a	(±1,360)
	30	2,047 ^a	(±0,942)	3,820 ^a	(±2,495)	3,140 ^a	(±1,801)
	60	15,680 ^a	(±2,852)	12,680 ^a	(±1,533)	14,840 ^a	(±1,839)
	90	13,133 ^a	(±2,230)	11,827 ^a	(±0,849)	10,950 ^a	(±3,728)
	120	8,093 ^b	(±1,836)	13,717 ^a	(±1,587)	14,003 ^a	(±2,866)
drumsticks							
L*	1	54,56 ^a	(±0,970)	52,78 ^a	(±1,730)	54,40 ^a	(±2,930)
	30	74,800 ^a	(±2,049)	77,950 ^a	(±0,606)	76,367 ^a	(±0,882)
	60	54,083 ^b	(±1,138)	59,010 ^a	(±0,864)	55,090 ^b	(±1,872)
	90	59,267 ^a	(±1,079)	51,903 ^b	(±2,045)	56,467 ^a	(±0,800)
	120	52,350 ^b	(±1,516)	58,793 ^a	(±2,134)	57,267 ^a	(±1,041)
a*	1	13,95 ^a	(±1,150)	16,76 ^a	(±0,650)	15,90 ^a	(±2,360)
	30	11,290 ^a	(±2,194)	5,520 ^b	(±0,306)	7,197 ^b	(±0,943)
	60	16,433 ^a	(±1,528)	14,780 ^a	(±0,391)	17,417 ^a	(±2,471)
	90	15,330 ^c	(±0,182)	20,687 ^a	(±0,573)	17,583 ^b	(±0,993)
	120	20,010 ^a	(±0,750)	19,233 ^a	(±1,620)	15,117 ^b	(±1,388)
b*	1	10,42 ^a	(±2,070)	11,77 ^a	(±1,750)	12,20 ^a	(±0,460)
	30	1,347 ^b	(±0,621)	8,227 ^a	(±3,127)	2,723 ^{ab}	(±2,748)
	60	12,243 ^a	(±4,752)	14,067 ^a	(±3,605)	11,617 ^a	(±3,629)
	90	16,127 ^a	(±2,552)	10,957 ^a	(±2,223)	12,660 ^a	(±3,168)
	120	9,533 ^b	(±1,693)	17,763 ^a	(±1,193)	9,133 ^b	(±1,331)

a, b, c are analyzed vertically between the three treatments in the same range. Different letters show significant differences (P<0,05) by Tukey test. The standard deviation is in parentheses. (T1) control diet, (T2) diet supplemented with 5g olive leaves/kg feed, (T3) diet supplemented with 10g olive leaves/kg feed.

Table 4 - Mean values Profile of free fatty acids thighs and drumsticks storage frozen at -18°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) for 120 days.

Parameter		Storage time (Days)			
		30	60	90	120
Σ (SFA)	T1	32,72	32,08	30,36	32,32
	T2	31,56	31,29	31,45	32,44
	T3	31,21	31,65	31,44	31,33
Σ (MUFA)	T1	43,11	43,24	41,74	45,05
	T2	46,49	43,56	41,48	43,95
	T3	45,32	44,94	42,62	46,55
Σ (PUFA)	T1	21,11	22,10	23,34	21,79
	T2	19,32	21,68	18,30	19,75
	T3	20,55	20,00	20,29	19,94
C 14:0	T1	0,87 ^a	0,45 ^a	0,41 ^a	0,49 ^a
	T2	0,61 ^a	0,41 ^a	0,41 ^a	0,45 ^a
	T3	0,46 ^a	0,48 ^a	0,45 ^a	0,48 ^a
C 15:0	T1	0,11 ^a	0,58 ^a	0,54 ^a	0,06 ^a
	T2	0,11 ^a	0,65 ^a	0,32 ^a	0,07 ^a
	T3	0,10 ^a	0,67 ^a	0,26 ^a	0,06 ^a
C 16:0	T1	23,13 ^a	22,67 ^a	21,34 ^a	23,83 ^a
	T2	23,04 ^a	21,94 ^a	22,65 ^a	24,06 ^a
	T3	22,93 ^a	22,06 ^a	22,49 ^a	23,92 ^a
C 18:0	T1	8,29 ^a	7,84 ^a	7,53 ^a	7,44 ^a
	T2	7,47 ^a	7,80 ^a	7,53 ^a	7,43 ^a
	T3	7,31 ^a	7,92 ^a	7,71 ^a	6,48 ^a
C 22:0	T1	0,13 ^a	0,35 ^a	0,35 ^a	0,28 ^a
	T2	0,12 ^a	0,27 ^a	0,35 ^a	0,26 ^a
	T3	0,19 ^a	0,27 ^a	0,34 ^a	0,17 ^a
C 22:0	T1	0,13 ^a	0,35 ^a	0,35 ^a	0,28 ^a
	T2	0,12 ^a	0,27 ^a	0,35 ^a	0,26 ^a
	T3	0,19 ^a	0,27 ^a	0,34 ^a	0,17 ^a
C 16:1	T1	4,04 ^a	4,44 ^a	4,10 ^a	4,70 ^a
	T2	4,53 ^a	2,89 ^a	1,70 ^a	3,24 ^a
	T3	4,22 ^a	4,56 ^a	4,87 ^a	5,37 ^a
C 18:1 n9	T1	38,22 ^a	36,98 ^a	37,32 ^a	38,15 ^a
	T2	41,11 ^a	37,81 ^a	38,92 ^a	38,59 ^a
	T3	40,23 ^a	37,20 ^a	37,12 ^a	39,71 ^a
C 20:1	T1	0,31 ^a	0,24 ^a	0,31 ^a	0,30 ^a
	T2	0,32 ^a	1,07 ^b	0,30 ^a	0,28 ^a
	T3	0,28 ^a	1,17 ^b	0,31 ^a	0,25 ^a
C 18:2 n6	T1	19,53 ^a	20,64 ^a	21,78 ^a	20,38 ^a
	T2	17,96 ^a	20,40 ^a	18,13 ^b	18,50 ^a
	T3	19,49 ^a	19,69 ^a	19,20 ^{ab}	18,62 ^a
C 20:2	T1	0,17 ^a	0,22 ^a	0,19 ^a	0,14 ^a
	T2	0,09 ^a	0,29 ^a	0,17 ^a	0,14 ^a
	T3	0,08 ^a	0,30 ^a	0,15 ^a	0,10 ^a

a, b, c are analyzed vertically between the three treatments in the same range. Different letters show significant differences ($P < 0,05$) by Tukey test. (T1) control diet, (T2) diet supplemented with 5g olive leaves/kg feed, (T3) diet supplemented with 10g olive leaves/kg feed.

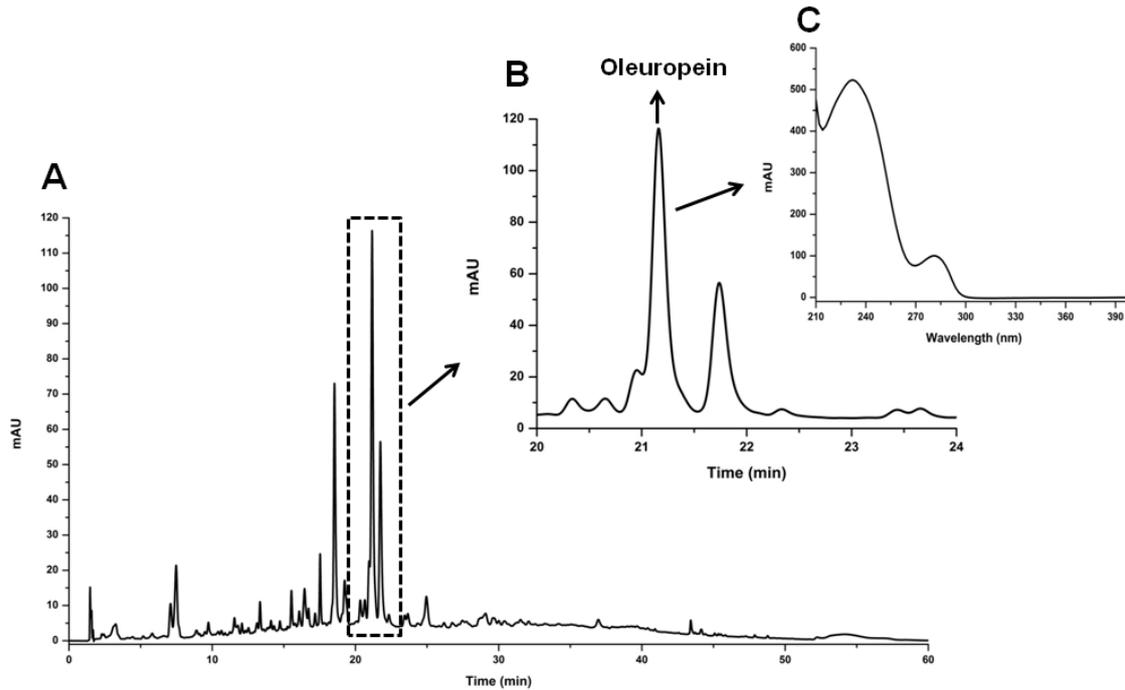


Figure 1 - A) Chromatographic profile obtained by HPLC_DAD for the methanolic extraction from powder prepared from olive leaves (diluted 20 times). B) Amplification of the region between 20 and 24 minutes of the chromatographic profile, showing, in detail the oleuropein peak. C) UV spectrum for the oleuropein peak.

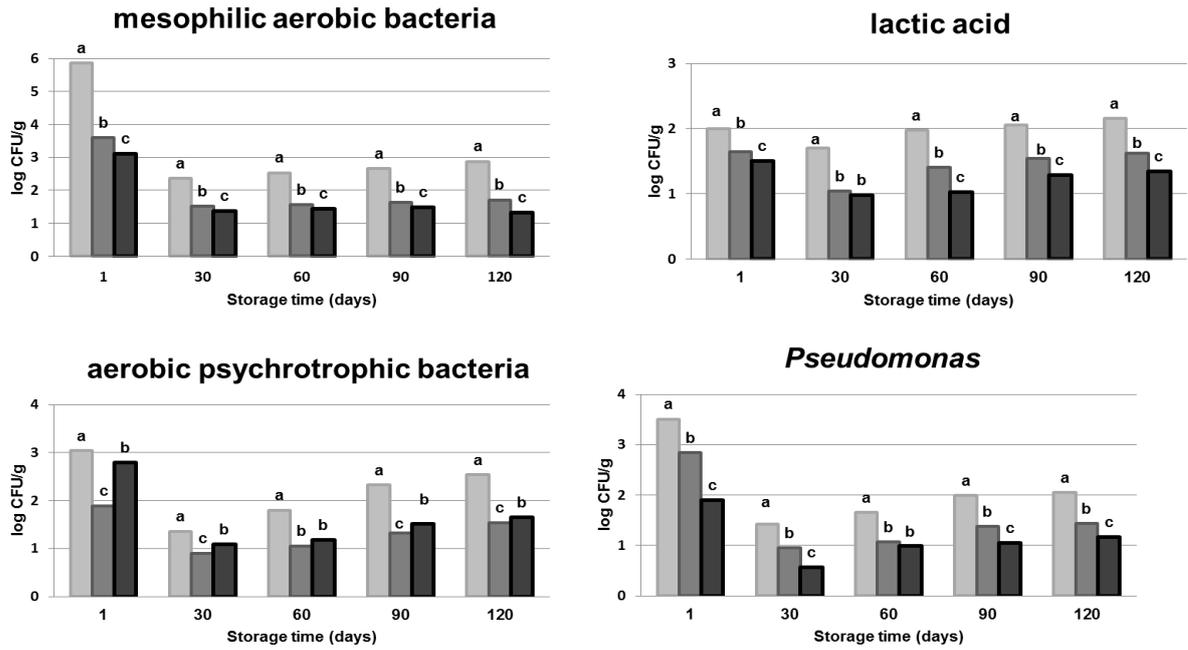


Figure 2 - Number of colonies (log₁₀ CFU/g) mesophilic aerobic bacteria, lactic acid, aerobic psychrotrophic bacteria and *Pseudomonas* in thighs and drumsticks of broiler storage at -18°C (±1°C) for 120 days; a, b, c are analyzed between T1, T2 and T3 for analysis interval. Different letters show significant difference (P<0.05) by Tukey test. (T1) control diet (■), (T2) diet supplemented with 5g olive leaves/kg feed (■), (T3) diet supplemented with 10g olive leaves/kg feed (■).

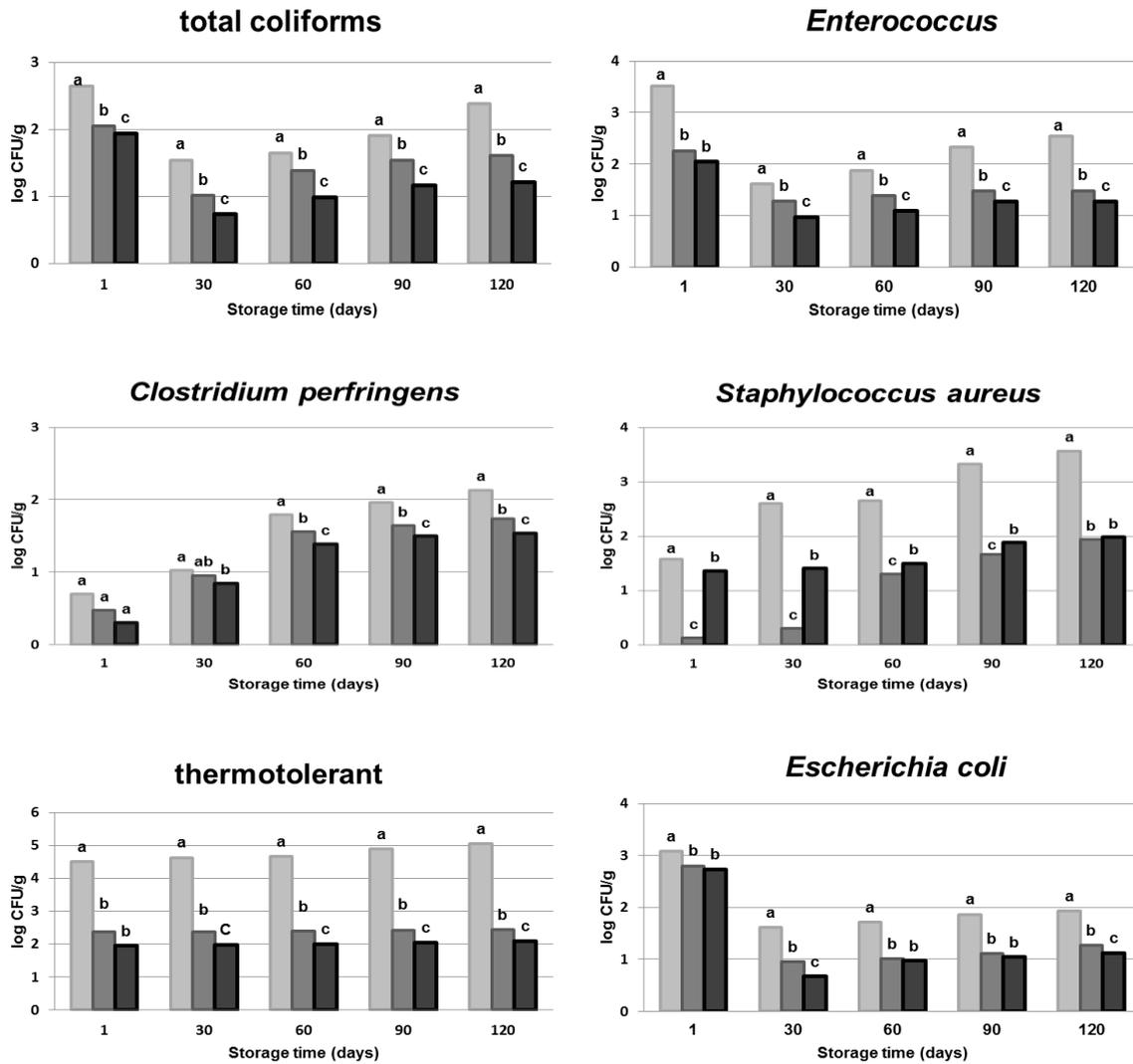


Figure 3 – Number of colonies (\log_{10} CFU/g) total coliforms, *Enterococcus* spp., *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, thermotolerant and *Escherichia coli* in thighs and drumsticks of broiler storage at -18°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) for 120 days; a, b, c are analyzed between T1, T2 and T3 for analysis interval. Different letters show significant difference ($P < 0.05$) by Tukey test. (T1) control diet (■), (T2) diet supplemented with 5g olive leaves/kg feed (■), (T3) diet supplemented with 10g olive leaves/kg feed (■).

5 DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS FOLHAS DE OLIVEIRA (*OLEA EUROPAEA* L.)

O aspecto das folhas de Oliveira (*Olea europaea* L.) da variedade Ascolano coletadas de uma plantação com 5 anos de idade na Epagri/Cepaf/Chapecó pode ser observado na Figura 6 - A.



Figura 6 – A) Folhas de oliveira após colheita.

B) Folhas de Oliveira após secagem e moagem.

Após passar por processo de limpeza por catação, as folhas de oliveira foram secas, moídas (Figura 6 – B) e analisadas físico quimicamente, apresentando em base seca 4,65% de umidade, 4,69% de resíduo mineral fixo, 1,38% de lipídios, 23,3% de fibra bruta e 12,73 % de proteína bruta. Em estudo realizado por BOTSOGLOU et al., (2010) folhas de oliveira foram secas a 45°C durante 72 horas, e moídas em peneira de 2mm e apresentaram valores de umidade e resíduo mineral fixo em base seca de 5,0% e 5,4% respectivamente, valores próximos aos encontrados neste estudo. O teor de umidade encontrada nas folhas de oliveira neste estudo de 4,65% não é favorável ao desenvolvimento de bolores e leveduras, conferindo

assim boa qualidade ao composto obtido. Lafka et al., (2013) caracterizou folhas de oliveira e também encontrou valores próximos ao deste estudo para gordura (1,2%) e resíduo mineral fixo (3,7%).

Os ácidos graxos majoritários encontrados nas folhas de oliveira da variedade Ascolano (Tabela 4) em ordem decrescente de percentual foram: alfa-linolênico (18:3 n-3), palmítico (16:0), oleico (18:1n-9), linoléico (18:2n-6) e esteárico (18:0). Em menores proporções foi encontrado o ácido graxo monoinsaturado gadoleico (C 20:1) e n-heneicosóico (C 21:0). CAVALHEIRO et al.; (2014) estudaram as folhas de oliveira da variedade Arbequina e encontraram os seguintes teores de ácidos graxos: 14:0 (1,61±0,03%), 16:0 (23,91±0,23%), 18:0 (3,93±0,07%), 18:1 (10,20±0,26%), 18:2n6 (11,74±0,16%) e 18:3n3 (46,72±0,75%), que podem ser considerados equivalentes aos encontrados neste estudo. A concentração de ácido linolênico, em relação aos demais ácidos graxos, foi maior tanto no estudo realizado por CAVALHEIRO et al.; (2014) quanto no presente trabalho. Outros ácidos graxos determinados nas folhas de oliveira são os mesmos que estão presentes no azeite de oliva e podem apresentar efeitos benéficos à saúde (CANELA & GONZÁLEZ, 2011), indicando um possível benefício do consumo das folhas de oliveira estudadas. Segundo Paiva-Martins et al. (2009), uma melhora na qualidade da carne de suínos alimentados com diferentes proporções de folhas de oliveira (5% e 10%) foi observada. Os compostos presentes nas folhas, mesmo sendo utilizadas em baixa quantidade, foram capazes de evitar danos oxidativos, provavelmente relacionados à presença de ácidos graxos essenciais e de compostos fenólicos. As razões de n6/n3, tanto para as folhas quanto para o azeite de oliva são descritas na Tabela 4, e demonstram que esta razão das folhas (0,23) é mais favorável que a do azeite (15,53) - o recomendado são valores inferiores a 4, assim, verifica-se um possível benefício do consumo das folhas para a dieta.

Tabela 4 - Perfil dos ácidos graxos livres das folhas de oliveira da variedade Ascolano após secagem e moagem.

Perfil ácidos graxos (%)	Nomenclatura usual	Variedade Ascolano	Azeite de Oliva*
Saturados (SFA)		32,099	20,33
C 14:0	Mirístico	0,745 (±0,019)	
C 16:0	Palmítico	23,453 (±0,163)	18,00
C 17:0	Heptadecanóico	0,445 (±0,096)	
C 18:0	Esteárico	3,635 (±0,603)	1,63
C 20:0	araquídico	1,308 (±0,396)	
C 21:0	n-heneicosóico	0,385 (±0,099)	
C 22:0	behênico	0,792 (±0,373)	
C 23:0	tricosanóico	0,423 (±0,035)	
C 24:0	Lignocérico	0,913 (±0,236)	
Monoinsaturados (MUFA)		14,228	62,68
C 16:1	Palmitoléico	0,710 (±0,341)	
C 20:1	Gadoléico	0,322 (±0,049)	
C 18:1 n9	Oléico	13,196 (±2,266)	59,90
Poli-insaturados (PUFA)		53,674	12,56
C 18:2 n6	Linoléico	10,009 (±1,275)	11,80
C 18:3 n3	Alfa-Linolenico	43,665 (±2,935)	0,76
n6/n3		0,23	15,53

O desvio padrão encontra-se entre parênteses. *Dados referentes ao azeite de oliva da variedade Arbequina cultivada no município de Caçapava do Sul em 2011 (MELLO & PINHEIRO, 2012).

A atividade antimicrobiana dos extratos de oliveira foi avaliada frente nove cepas bacterianas, sendo seis Gram negativas e três Gram positivas. A escolha das cepas ocorreu por serem bactérias causadoras de Doenças de Origem Alimentar (DTA's) e/ou provocarem alterações organolépticas e nutricionais nos alimentos, diminuindo sua aceitabilidade e vida de prateleira.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores da Concentração Inibitória Mínima (CMI) em mg/ml do extrato bruto da folha de oliveira (*Olea europaea* L.) in natura e após secagem. Todas as bactérias testadas apresentaram sensibilidade frente aos extratos.

Tabela 5 - Valores de CMI para extratos de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) frente a bactérias gram positivas e negativas.

Micro-organismo	Concentração Inibitória Mínima – CMI (mg/mL)	
	Extrato folha in natura	Extrato folha seca
<i>Clostridium perfringens</i>	5	> 20
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	> 20
<i>Listeria monocytogenes</i>	> 20	> 20
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10	> 20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	> 20
<i>Salmonella typhimurium</i>	20	> 20
<i>Shigella dysenterial</i>	1	0,156
<i>Yersinia enterocolítica</i>	0,625	0,156
<i>Escherichia coli</i>	0,625	0,078

Para as bactérias *Yersinia enterocolítica*, *Escherichia coli* e *Shigella dysenterial*, ambos os extratos de oliveira apresentaram valores entre 0,07 e 1 mg/ml, sendo os micro-organismos mais sensíveis ao extrato da folha seca, conforme Tabela 5. Para os micro-organismos *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* e *Clostridium perfringens* verificou-se menor ação inibitória dos extratos de folha seca, com CMI acima de 20 mg/ml, sendo estes micro-organismos mais sensíveis ao extrato de folha in natura. BENLARDI et al.; (2014) estudaram a oliveira da variedade *sylvestris* Tar e encontraram os seguintes valores de CMI: *E Coli* (0,1 mg/ml), *S. aureus* (0,05 mg/ml), *P. aeruginosa* (0,1 mg/ml), *L monocytogenes* (0,1 mg/ml). Os valores mostram similaridade aos encontrados neste estudo, e indicam que as folhas de oliveira podem ser úteis como agente com atividade antimicrobiana, especialmente frente à *pseudomonas*, que segundo NEU (1992), é classificada como bactéria resistente.

Em estudo realizado por Gökmen et al., (2014) para avaliar a atividade antimicrobiana in vitro de extrato de folhas de oliveira frente bactérias gram-negativas e gram-positivas foi verificada inibição para *L. monocytogenes*, *E. coli* O157, *E. sakazakii* e *P. aeruginosa* com $\geq 32 \text{ mg ml}^{-1}$ e *B.cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. vulgaris*, *E.coli* e *S. typhimurium* com $\geq 16 \text{ mg ml}^{-1}$. Upadhyay, (2014) avaliou a atividade antibacteriana e antifúngica do óleo essencial de oliveira in vitro e verificou efeito positivo para *E. coli*, *Bacillus cereus*, *L. acidophilus* e *S. pneumoniae*, sendo que a atividade positiva foi atribuída a presença de metabólitos

secundários como terpenos, esteroides, flavonoides, ésteres e ácidos identificados no óleo essencial. Tem sido relatado por muitos pesquisadores que o extrato de folhas de oliveira possui atividade antimicrobiana em virtude do seu alto teor de compostos fenólicos (Pereira et al., 2007; Sudjana et al., 2009; Aytul, 2010; Gökmen et al., 2014).

A concentração de compostos fenólicos totais encontrados nos extratos das folhas de oliveira antes e após a secagem pode ser visualizado na Tabela 6. Os resultados demonstram maior quantidade de compostos fenólicos totais nas folhas de oliveira antes da secagem, e uma redução de aproximadamente 22% após a secagem.

Tabela 6 - Concentração de compostos fenólicos totais no extrato aquoso das folhas de oliveira (*Olea europaea* L.), obtidos de folhas secas e antes de secar.

Folhas de oliveira	Fenólicos totais (mg/g)
Antes da secagem	12.275
Após secagem	9.525

A quantidade de compostos fenólicos totais da variedade Ascolano de 9,525 mg de equivalente de ácido gálico/g de folhas secas ficou abaixo dos valores encontrados por Botsoglou, et al (2012) que avaliou o conteúdo total de compostos fenólicos das folhas de oliveira de variedade desconhecida, e encontrou 12,46 \pm 0,58 mg de equivalentes de catequina/g de folhas secas. Também ficou abaixo dos valores encontrados por Botsoglou, et al (2010) que encontrou teor total de compostos fenólicos de 23,8 mg de equivalentes de ácido gálico/g folhas secas e por Cavalheiro (2014), que encontrou 30,21 \pm 0,31mg GAE g⁻¹ em folhas de oliveira da variedade Arbequina. A diferença nas concentrações obtidas nas diferentes variedades pode ter sido influenciada pelos métodos de extração utilizados, devido à utilização de diferentes temperaturas de extração, tipos de solvente, tempo de extração, entre outros, que são parâmetros que afetam diretamente no rendimento das extrações (MUSTAFA & TURNER, 2011) além, é claro, das condições de cultivo e da diferença entre as cultivares.

Na Figura 7 pode ser visualizado o perfil cromatográfico obtido por HPLC-DAD para o extrato metanólico da amostra de pó preparado a partir das folhas de oliveira (diluído 20 vezes).

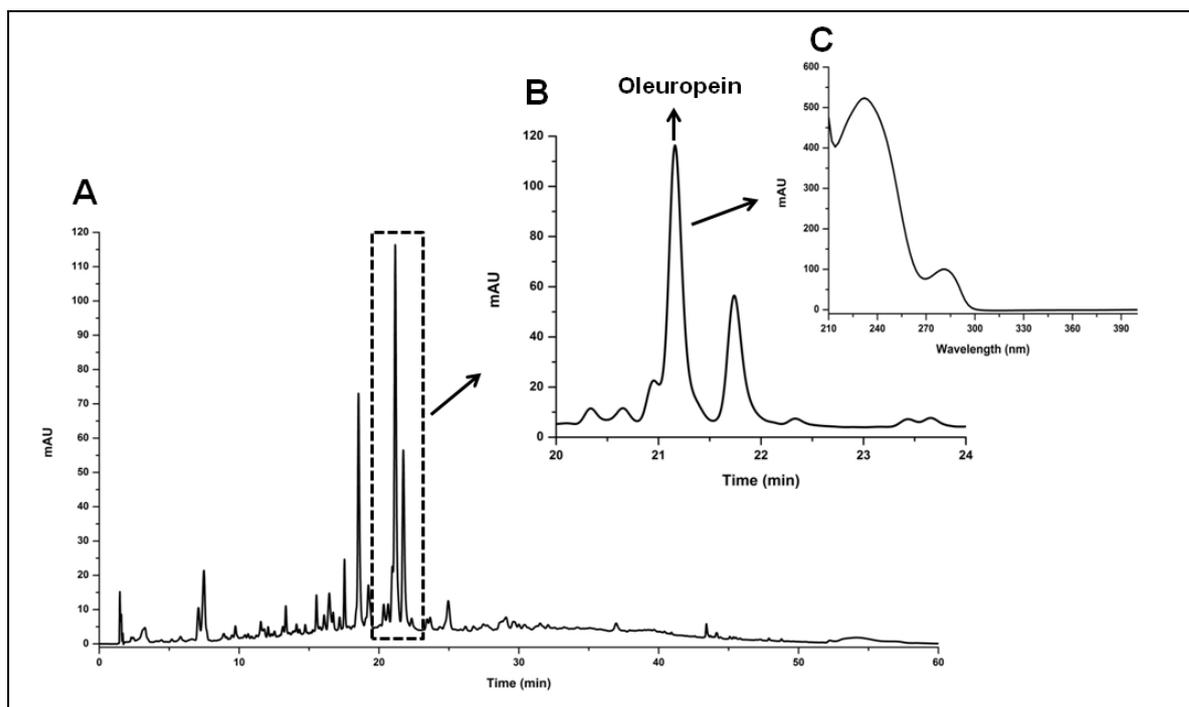


Figura 7 - Perfil cromatográfico do extrato metanólico da amostra em pó das folhas de oliveira da variedade *Ascolano*. **A)** Perfil cromatográfico obtido por HPLC-DAD para o extrato metanólico do pó preparado a partir de folhas de oliveira (diluído 20 vezes). **B)** Ampliação da região entre 20 e 24 min do perfil cromatográfico, mostrando em detalhe o pico da oleuropeína. **C)** Espectro UV para o pico da oleuropeína.

O teor de oleuropeína encontrado nas folhas de oliveira foi de $15,0 (\pm 0,8) \text{ g.kg}^{-1}$ (CV de 5,1%, $n = 3$). Este valor foi menor ao encontrado por Paiva-Martins, et al (2009) que obteve $22,3 (\pm 0,18) \text{ g.kg}^{-1}$ de oleuropeína em folhas de oliveira e por Aytul, (2010) que encontrou $21,58 \text{ g.kg}^{-1}$ de oleuropeína em extrato de folhas de oliveira. Afaneh, Yateem & Al-Rimawi (2015) encontraram teores de oleuropeína de $10 \text{ mg/g} (\pm 0,26)$ em folhas de oliveira após secagem e conteúdo menor em folhas frescas de $2,5 \text{ mg/g} (\pm 0,21)$. De acordo com Aytul (2010), a oleuropeína evita a formação de radicais livres pela sua capacidade de quelar metais como o cobre e ferro, que catalisam reações de geração de radicais livres, tais como a oxidação de lipídios. Como uma ação de proteção, a oleuropeína pode também neutralizar radicais diretamente, fornecendo grupos hidroxila (Galli & Visioli, 1999). Pereira et al, (2007) ainda menciona que a oleuropeína tem ação na inibição de patógenos como *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*.

5.2 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS ANIMAIS

A Tabela 7 apresenta o desempenho dos frangos pertencentes aos três tratamentos durante os 42 dias que receberam ração. No início do experimento os frangos pertencentes aos três tratamentos apresentaram o mesmo peso inicial (PI) de 46g, e aos 42 dias quando foram abatidos, os frangos dos tratamentos T1 e T3 apresentaram maior peso final (PF) diferindo significativamente ($P<0,05$), em relação aos frangos pertencentes ao tratamento T2. Este resultado pode ter sido influenciado pela quantidade de consumo de ração total (CRT), uma vez que ocorreu maior consumo de ração nos tratamentos T1 e T3 (Tabela 7).

Tabela 7 - Desempenho dos frangos pertencentes aos três tratamentos durante os 42 dias que receberam a ração.

Desempenho Zootécnico								
Tratamentos	PI (g)	PF (g)	CRT (g)	CRD (g)	GP (g)	GPD (g)	CA*	TM (%)
T1	46,000 ^a (±0,00)	2773,167 ^b (±58,60)	4304,333 ^a (±78,24)	100,101 ^a (±1,82)	2727,167 ^a (±58,60)	63,422 ^a (±1,36)	1,578 ^a (±0,02)	0,238 ^a (±0,00)
T2	46,000 ^a (±0,00)	2756,250 ^a (±46,24)	4271,500 ^b (±63,28)	99,337 ^b (±1,47)	2710,250 ^b (±46,24)	63,029 ^b (±1,08)	1,576 ^b (±0,02)	0,119 ^a (±0,00)
T3	46,000 ^a (±0,00)	2799,083 ^b (±44,27)	4343,917 ^a (±60,58)	101,021 ^a (±1,40)	2753,083 ^a (±44,27)	64,025 ^a (±1,02)	1,578 ^a (±0,02)	0,000 ^b (±0,00)

Nota 1: a,b,c são analisadas na vertical. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P<0,05$) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

Nota 3: PI (peso Inicial), PF (Peso Final), CRT (Consumo de Ração Total), CRD (Consumo Ração Diário), GP (Ganho de Peso), GPD (Ganho de Peso Diário), CA (Conversão Alimentar), TM (Taxa de Mortalidade).

*Consumo de ração em um determinado tempo/ganho de peso.

A partir do consumo de ração total (CRT) e do ganho de peso (GP) dos frangos foi obtida a conversão alimentar (CA). Para este parâmetro os frangos que receberam dieta suplementada com folhas de oliveira na quantidade de 5g/kg de ração (T2), apresentaram os melhores valores, diferindo significativamente dos frangos pertencentes a T3.

Para os frangos que receberam dieta com folhas de oliveira na quantidade de 10g/kg de ração (T3) não foi registrada mortalidade (TM) durante todo o período de criação, diferenciando significativamente ($P<0,05$) dos tratamentos T1 e T2. Christaki, Bonos &

Florou-Paneri, (2011) utilizaram folhas de oliveira na dieta de codornas japonesas e obtiveram melhoria significativa na produção de ovos em relação ao tratamento controle, mas não verificaram diferença na taxa de mortalidade em relação ao controle, sendo os benefícios do uso das folhas de oliveira atribuídos à presença de polifenóis e a oleuropeína.

Erener et al., (2009), relataram que a suplementação de dietas de frangos com extratos de folhas de oliveira proporcionaram um aumento no peso corporal e uma melhoria na taxa de conversão alimentar dos animais. Em estudo realizado em codornas japonesas, Christaki et al., (2011) relataram que as folhas de oliveira não tiveram efeito significativo no consumo de ração ou na taxa de conversão alimentar. No entanto, foi relatado que os grupos que receberam ração suplementada com folhas de oliveira tiveram um consumo de ração relativamente maior que o grupo controle. Cayan & Erener (2015) avaliaram o efeito de folhas de oliveira sobre o desempenho durante crescimento de galinhas poedeiras e não verificaram influencia sobre o consumo de ração e conversão alimentar, mas registraram aumento do peso corporal dos animais em relação ao controle. No presente estudo, foi verificada CA significativamente melhor pelo tratamento que recebeu 5 g de folhas de oliveira/kg de ração enquanto os animais que receberam 10g de folhas de oliveira/kg de ração registraram a mesma CA que o controle. Embora o peso final dos animais não tenha sido maior para ambos os tratamentos que receberam folhas de oliveira em relação ao controle, o desempenho dos animais não foi afetado negativamente, o que pode ser constatado pela TM, que foi menor para os tratamentos que receberam folhas de oliveira na dieta. Os resultados positivos para o desempenho zootécnico (taxa de mortadelaide e conversão alimentar) dos frangos alimentados com folhas de oliveira em relação aos que receberam dieta convencional indica que as folhas de oliveira podem constituir uma alternativa a alimentação de monogástricos.

5.3 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS COXAS E SOBRECoxAS ARMAZENADAS RESFRIADAS

Os valores de proteína no 1º dia de armazenamento encontrados nas coxas e sobrecoxas (Tabela 8) foram 18,070, 17,920 e 18,011 para T1, T2 e T3, respectivamente. No período de análise de 12 dias não foi verificada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Os resultados encontrados ficaram próximos aos apresentados na Tabela

Brasileira de Composição de Alimentos (1998), que indica valores de 17,6% e 17,8% de proteína para carne de sobrecoxa e coxa de frango, respectivamente. Tonetti, Nicoletti & Ströher (2011), ao determinarem as características físico-químicas de frangos também encontraram valores semelhantes a este estudo, sendo 17,25 e 18,06 g/100g de proteínas em coxas e sobrecoxas.

A determinação de lipídeos nas amostras de coxas e sobrecoxas (Tabela 8) indicou valores iniciais de 6,836; 9,284 e 5,807 % para T1, T2 e T3, respectivamente. Os valores para T2 assemelham-se aos encontrados por Torres e colaboradores (2000) que avaliaram a composição centesimal de coxas de frango e encontraram valores de 9,32% de lipídeos. Os valores de lipídeos de T2 também se assemelham ao encontrado na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (1998) de 9,6% de lipídeos para a sobrecoxa de frango. A mesma Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (1998) indica 4,9% de lipídeos para a coxa de frango, valores mais próximos aos encontrados nos tratamentos T1 e T3 neste estudo. A análise de lipídeos indicou diferença significativa apenas no 1º dia de acompanhamento entre T2 e os demais Tratamentos. No 7º e 12º dia de acompanhamento, as análises indicaram T3 como a amostra que mais possuía teor de lipídios, apesar dos três tratamentos não apresentarem diferença significativa entre si nestes períodos.

O músculo de frango vivo possui valor do pH de 7,2. Ocorrido o abate, a carne continua em processo bioquímico, no qual o condutor energético do músculo é transformado em glicogênio láctico através da ação de várias enzimas. O pH da carne de frango diminui devido à formação ácida, onde a carne deve apresentar pH final entre 5,7 e 5,9. Passado 24 horas, se o pH estiver superior a 6,2, a carne de frango irá se encontrar com grande retenção de água, o que implica carne DFD (darck, firm, dry – escura, dura e seca). Caso o pH se encontre abaixo de 5,8 em menos de 4 horas, teremos a carne PSE (pale, soft, exudative – pálida, mole e exsudativa) (VENTURINI, SARCINELLI & SILVA; 2007). O resultado da análise de pH deste estudo apresentado na Tabela 5 mostra que os valores iniciais de pH para os três tratamentos ficaram entre 5,8 e 5,9, o que é indicativo de ausência de PSE e DFD nos três tratamentos avaliados. Aos 12 dias de acompanhamento os valores de pH atingiram 6,070; 6,047 e 5,887 para T1, T2 e T3, respectivamente, onde T3 apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) para os outros tratamentos.

O resíduo mineral fixo para coxa e sobrecoxa de frango pode variar entre 0,8 a 1,8% (ROÇA, 1999). Os teores encontrados nas coxas e sobrecoxas no primeiro dia de análise foram de 0,917, 0,920 e 0,927% para T1, T2 e T3, respectivamente (Tabela 8). Estes valores

ficaram muito próximos aos encontrados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (1998) que indica 0,9% de cinzas para coxas e sobrecoxas de frango.

O percentual de umidade encontrado no primeiro dia de análise foi de 69,473; 67,750 e 68,267% para T1, T2 e T3, respectivamente (Tabela 8). Estes valores foram menores do que os encontrados por TORRES et al., (2000) em coxas de frango de 70,51%, e também pelos apresentados pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (1998), a qual indica 72,7% de umidade para sobrecoxa e 76,6% de umidade para a coxa de frango. Os teores de umidade reduziram para os três tratamentos no decorrer do armazenamento a 4°C e finalizaram com valores entre 66,417 e 67,340%. Não foi verificada diferença significativa para a umidade entre os tratamentos durante o período de análise das coxas e sobrecoxas.

Os valores de a_w observados na Tabela 8 indicaram que a introdução de oliveira via dieta nos frangos (T2 e T3) proporcionou a obtenção de um músculo cárneo com a_w significativamente ($P < 0,05$) menor que T1 durante os 12 dias de análise.

O perfil de ácidos graxos livres apresentado na Tabela 9, indicou não haver diferença significativa ($P > 0,05$) entre os três tratamentos durante os 12 dias de armazenamento. Os ácidos graxos majoritários encontrados nas coxas e sobrecoxas de frango em ordem decrescente foram o oleico (18:1 n-9), linoleico (18:2 n-6), palmítico (16:0) e esteárico (18:0).

Tabela 8 - Valores de lipídios, proteína, umidade, resíduo mineral fixo, pH e a_w nas coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 12 dias.

Parâmetros		Período de análise		
		1	7	12
Lipídeos (g kg ⁻¹)	T1	6,836 ^b	4,912 ^a	4,755 ^a
		($\pm 0,179$)	($\pm 0,479$)	($\pm 0,651$)
	T2	9,284 ^a	4,791 ^a	4,627 ^a
		($\pm 0,515$)	($\pm 0,735$)	($\pm 0,476$)
	T3	5,807 ^b	6,238 ^a	5,069 ^a
		($\pm 0,259$)	($\pm 0,340$)	($\pm 0,475$)
Proteína (g kg ⁻¹)	T1	18,070 ^a	18,200 ^a	17,850 ^a
		($\pm 0,010$)	($\pm 0,100$)	($\pm 0,010$)
	T2	17,920 ^a	18,110 ^a	17,900 ^a
		($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)
	T3	18,011 ^a	18,150 ^a	18,010 ^a
		($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)
umidade (%)	T1	69,473 ^a	67,983 ^a	67,340 ^a
		($\pm 0,890$)	($\pm 1,000$)	($\pm 1,002$)
	T2	67,750 ^a	66,667 ^a	66,417 ^a
		($\pm 0,630$)	($\pm 0,100$)	($\pm 1,079$)
	T3	68,267 ^a	67,533 ^a	67,007 ^a
		($\pm 0,900$)	($\pm 1,000$)	($\pm 1,106$)
Resíduo mineral fixo (%)	T1	0,917 ^a	0,890 ^a	0,853 ^a
		($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,038$)
	T2	0,920 ^a	0,900 ^a	0,850 ^a
		($\pm 0,025$)	($\pm 0,025$)	($\pm 0,021$)
	T3	0,927 ^a	0,887 ^a	0,867 ^a
		($\pm 0,125$)	($\pm 0,125$)	($\pm 0,012$)
pH	T1	5,897 ^a	6,013 ^a	6,070 ^a
		($\pm 0,015$)	($\pm 0,025$)	($\pm 0,020$)
	T2	5,840 ^a	5,870 ^b	6,047 ^a
		($\pm 0,010$)	($\pm 0,047$)	($\pm 0,040$)
	T3	5,820 ^b	5,857 ^b	5,887 ^b
		($\pm 0,017$)	($\pm 0,015$)	($\pm 0,021$)
a_w	T1	0,995 ^a	0,995 ^a	0,995 ^a
		($\pm 0,000$)	($\pm 0,000$)	($\pm 0,000$)
	T2	0,994 ^b	0,994 ^b	0,994 ^b
		($\pm 0,000$)	($\pm 0,000$)	($\pm 0,000$)
	T3	0,994 ^b	0,994 ^b	0,994 ^b
		($\pm 0,000$)	($\pm 0,000$)	($\pm 0,000$)

Nota 1: a,b,c são analisadas na vertical entre T1, T2 e T3 por intervalo de análise. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

Tabela 9 - Perfil de ácidos graxos livres, nas coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 12 dias.

Perfil	T1			T2			T3		
	1 dia	7 dias	12 dias	1 dia	7 dias	12 dias	1 dia	7 dias	12 dias
Saturados									
Σ (SFA)	28,256	28,432	29,830	30,010	28,426	30,667	29,581	33,338	29,685
C 14:0	0,361 ^a ($\pm 0,03$)	0,364 ^a ($\pm 0,00$)	0,440 ^a ($\pm 0,00$)	0,635 ^a ($\pm 0,23$)	0,393 ^a ($\pm 0,03$)	0,392 ^a ($\pm 0,17$)	0,502 ^a ($\pm 0,47$)	0,734 ^a ($\pm 0,44$)	0,410 ^a ($\pm 0,06$)
C 15:0	0,065 ^a ($\pm 0,02$)	0,050 ^a ($\pm 0,01$)	0,084 ^a ($\pm 0,00$)	0,136 ^a ($\pm 0,05$)	0,066 ^a ($\pm 0,00$)	0,076 ^a ($\pm 0,04$)	0,102 ^a ($\pm 0,13$)	0,133 ^a ($\pm 0,08$)	0,085 ^a ($\pm 0,01$)
C 16:0	20,600 ^a ($\pm 1,06$)	21,000 ^a ($\pm 0,76$)	20,680 ^a ($\pm 0,54$)	20,892 ^a ($\pm 1,89$)	20,968 ^a ($\pm 1,36$)	22,140 ^a ($\pm 0,30$)	20,454 ^a ($\pm 1,22$)	21,638 ^a ($\pm 0,48$)	21,207 ^a ($\pm 1,00$)
C 18:0	7,040 ^a ($\pm 0,18$)	6,820 ^a ($\pm 0,90$)	8,471 ^a ($\pm 0,39$)	8,147 ^a ($\pm 2,65$)	6,781 ^a ($\pm 0,70$)	7,892 ^a ($\pm 0,57$)	8,310 ^a ($\pm 1,13$)	10,663 ^a ($\pm 4,93$)	7,735 ^a ($\pm 1,62$)
C 20:0	0,191 ^a ($\pm 0,06$)	0,197 ^a ($\pm 0,01$)	0,155 ^a ($\pm 0,02$)	0,201 ^a ($\pm 0,07$)	0,219 ^a ($\pm 0,13$)	0,168 ^a ($\pm 0,06$)	0,213 ^a ($\pm 0,03$)	0,171 ^a ($\pm 0,02$)	0,249 ^a ($\pm 0,01$)
Monoinsaturados									
Σ (MUFA)	42,643	44,813	46,061	45,663	46,488	46,141	44,400	43,407	43,180
C 14:1	0,077 ^a ($\pm 0,01$)	0,094 ^a ($\pm 0,04$)	0,082 ^a ($\pm 0,00$)	0,110 ^a ($\pm 0,05$)	0,104 ^a ($\pm 0,00$)	0,083 ^a ($\pm 0,00$)	0,086 ^a ($\pm 0,04$)	0,093 ^a ($\pm 0,01$)	0,083 ^a ($\pm 0,01$)
C 16:1	3,892 ^a ($\pm 0,50$)	4,647 ^a ($\pm 1,07$)	4,057 ^a ($\pm 0,50$)	4,191 ^a ($\pm 0,68$)	4,725 ^a ($\pm 1,23$)	4,364 ^a ($\pm 0,26$)	3,756 ^a ($\pm 0,56$)	3,564 ^a ($\pm 0,91$)	4,020 ^a ($\pm 0,35$)
C 18:1 n9	36,862 ^a ($\pm 3,02$)	38,954 ^a ($\pm 0,64$)	39,873 ^a ($\pm 1,03$)	39,706 ^a ($\pm 2,54$)	40,391 ^a ($\pm 0,24$)	39,742 ^a ($\pm 2,31$)	38,365 ^a ($\pm 0,51$)	38,470 ^a ($\pm 2,16$)	37,714 ^a ($\pm 0,75$)
C 20:1	0,205 ^a ($\pm 0,15$)	0,348 ^a ($\pm 0,02$)	0,381 ^a ($\pm 0,17$)	0,398 ^a ($\pm 0,01$)	0,397 ^a ($\pm 0,03$)	0,190 ^a ($\pm 0,09$)	0,367 ^a ($\pm 0,05$)	0,490 ^a ($\pm 0,15$)	0,285 ^a ($\pm 0,14$)
C 22:1	1,241 ^a ($\pm 0,41$)	0,348 ^a ($\pm 0,02$)	1,369 ^a ($\pm 0,14$)	0,984 ^a ($\pm 0,31$)	0,397 ^a ($\pm 0,03$)	1,412 ^a ($\pm 1,05$)	1,395 ^a ($\pm 0,38$)	0,490 ^a ($\pm 0,15$)	0,786 ^a ($\pm 0,21$)
C 24:1	0,367 ^a ($\pm 0,11$)	0,422 ^a ($\pm 0,52$)	0,299 ^a ($\pm 0,10$)	0,275 ^a ($\pm 0,10$)	0,475 ^a ($\pm 0,12$)	0,349 ^a ($\pm 0,23$)	0,432 ^a ($\pm 0,14$)	0,299 ^a ($\pm 0,08$)	0,292 ^a ($\pm 0,11$)
Poli-insaturados									
Σ (PUFA)	23,147	22,15	20,267	17,810	20,368	19,001	19,862	17,993	23,301
C 18:2 n6	21,176 ^a ($\pm 4,24$)	20,24 ^a ($\pm 5,02$)	18,440 ^a ($\pm 1,35$)	16,251 ^a ($\pm 3,34$)	18,671 ^a ($\pm 1,76$)	17,488 ^a ($\pm 2,28$)	18,153 ^a ($\pm 3,69$)	16,281 ^a ($\pm 3,25$)	20,834 ^a ($\pm 1,68$)
C 20:2	0,185 ^a ($\pm 0,03$)	0,193 ^a ($\pm 0,05$)	0,222 ^a ($\pm 0,10$)	0,200 ^a ($\pm 0,04$)	0,207 ^a ($\pm 0,05$)	0,172 ^a ($\pm 0,07$)	0,213 ^a ($\pm 0,07$)	0,296 ^a ($\pm 0,14$)	0,179 ^a ($\pm 0,03$)
C 18:3 n3	1,320 ^a ($\pm 0,23$)	1,230 ^a ($\pm 0,20$)	1,119 ^a ($\pm 0,07$)	0,938 ^a ($\pm 0,20$)	0,992 ^a ($\pm 0,11$)	0,913 ^a ($\pm 0,16$)	1,007 ^a ($\pm 0,09$)	0,952 ^a ($\pm 0,24$)	1,089 ^a ($\pm 0,08$)
C 20:3 n6	0,097 ^a ($\pm 0,05$)	0,089 ^a ($\pm 0,00$)	0,110 ^a ($\pm 0,01$)	0,104 ^a ($\pm 0,01$)	0,085 ^a ($\pm 0,02$)	0,068 ^a ($\pm 0,04$)	0,094 ^a ($\pm 0,00$)	0,148 ^a ($\pm 0,08$)	0,089 ^a ($\pm 0,01$)
C 22:6	0,292 ^a ($\pm 0,08$)	0,298 ^a ($\pm 0,05$)	0,259 ^a ($\pm 0,01$)	0,247 ^a ($\pm 0,05$)	0,311 ^a ($\pm 0,09$)	0,279 ^a ($\pm 0,03$)	0,299 ^a ($\pm 0,03$)	0,255 ^a ($\pm 0,01$)	0,984 ^a ($\pm 0,88$)

Nota 1: a,b,c são analisadas na horizontal. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

As análises de TBARs, Índice de Peróxidos, Dienos conjugados, e Proteínas carboniladas em coxas e sobrecoxas armazenadas a 4°C são apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores de TBARs, Índice de peróxidos, Dienos conjugados, e Proteínas carboniladas em coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) durante 12 dias.

Parâmetros		Período de análise		
		1	7	12
TBARs (MDA equivalents, $\mu\text{g}/\text{Kg}$)	T1	0,059 ^a ($\pm 0,009$)	0,062 ^a ($\pm 0,031$)	0,150 ^b ($\pm 0,023$)
	T2	0,045 ^a ($\pm 0,011$)	0,052 ^a ($\pm 0,010$)	0,133 ^b ($\pm 0,024$)
	T3	0,089 ^a ($\pm 0,054$)	0,057 ^a ($\pm 0,031$)	0,245 ^a ($\pm 0,008$)
	T1	0,1791 ^a ($\pm 0,000$)	0,0455 ^a ($\pm 0,000$)	0,6426 ^a ($\pm 0,000$)
	T2	0,1472 ^a ($\pm 0,000$)	0,0397 ^a ($\pm 0,000$)	0,2692 ^b ($\pm 0,000$)
	T3	0,3491 ^a ($\pm 0,000$)	0,0917 ^a ($\pm 0,000$)	0,3130 ^b ($\pm 0,000$)
Dienos conjugados (abs./mg lip./ml ciclohexano)	T1	0,259 ^a ($\pm 0,020$)	0,074 ^a ($\pm 0,011$)	0,236 ^a ($\pm 0,023$)
	T2	0,251 ^a ($\pm 0,018$)	0,098 ^a ($\pm 0,015$)	0,206 ^a ($\pm 0,013$)
	T3	0,311 ^a ($\pm 0,063$)	0,083 ^a ($\pm 0,014$)	0,238 ^a ($\pm 0,030$)
	T1	1,235 ^a ($\pm 0,414$)	1,395 ^a ($\pm 0,030$)	0,818 ^a ($\pm 0,038$)
	T2	1,015 ^a ($\pm 0,361$)	1,840 ^a ($\pm 0,006$)	0,937 ^a ($\pm 0,171$)
	T3	0,973 ^a ($\pm 0,246$)	1,661 ^a ($\pm 0,096$)	0,921 ^a ($\pm 0,007$)

Nota 1: a,b,c são analisadas entre T1, T2 e T3 por intervalo de análise. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

Durante as etapas iniciais de autoxidação quando os ácidos graxos poli-insaturados são oxidados, ocorre formação de hidro peróxidos e deslocamento das duplas ligações, com consequente formação de dienos conjugados (SILVA, BORGES & FERREIRA, 1999; AOCS, 2004). Verificou-se pela Tabela 10, que houve formação de dienos conjugados nos 3 Tratamentos, desde o primeiro dia de armazenamento a 4°C. O valor de dienos conjugados para as coxas e sobrecoxas foi menor nos frangos que receberam dietas suplementadas com 5g de folhas de oliveira/kg de ração no 1 e 12º dia de análise.

O índice de peróxidos encontrado no primeiro dia de análise (Tabela 10) foi de 0,1791, 0,1472 e 0,3491 mEq/kg de amostra, para T1, T2 e T3, respectivamente. Esse índice avalia a rancidez oxidativa, resultante da autoxidação das gorduras insaturadas contidas nos tratamentos, que tem por consequência a destruição das vitaminas lipossolúveis e dos ácidos graxos essenciais e formação de sabor e odor característicos. Quando o índice de peróxidos atinge valores de 10 mEq/kg de amostra, o produto já está completamente rancificado e impróprio para o consumo. Porém, quando esse índice atinge o valor de 5 mEq/kg, as características organolépticas da gordura já apresentam alterações perceptíveis ao paladar (FERRARI & KOLLER, 2001). Os valores de índice de peróxidos nas amostras de coxa e sobrecoxa encontrados neste estudo ficaram abaixo de 1mEq/kg de amostra para os três tratamentos, indicando que eles possuíam características apropriadas para consumo durante todo o período de armazenamento a 4°C. Os valores de índice de peróxidos encontrados nas coxas e sobrecoxas de frango no 1° e 7° dia de análise não apresentaram diferença significativa entre os Tratamentos. Aos 12 dias verificou-se maior valor de peróxidos para T1, enquanto os tratamentos que receberam folhas de oliveiras (T2 e T3) apresentaram menores valores. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre T1 e os Tratamentos T2 e T3, o que pode ser indicativo de que a adição de folhas de oliveira via ração de dieta dos frangos tem capacidade de retardar o início do processo oxidativo.

O número de TBARs (Tabela 10) indicou menores valores para T2 (5g de oliveira/kg de ração) durante os 12 dias de armazenamento a 4°C. Em estudo realizado por Botsoglou et al., (2010) a suplementação de folhas de oliveira na ração de perus na quantidade de 5 e 10g/kg de ração indicou redução significativa ($P < 0,05$) nos valores de TBARs dos filés armazenados a 4°C por 12 dias em relação ao Tratamento controle durante todo o período de armazenamento. No 12° dia de acompanhamento os autores encontraram valor de TBARs de 0,7 mgMDA/kg de amostra para o tratamento com 5g de folhas de oliveira, ao passo que neste estudo foi encontrado 0,13 mg MDA/kg de amostra. Govaris et al., (2010) suplementou a dieta de perus e aos 12 dias, ao avaliar a carne de peito armazenada refrigerada obteve efeito antioxidante superior das folhas de oliveira em comparação ao alecrim para o teste de TBARs, com valores de 0,6 mg/Kg de MDA para o tratamento que recebeu 10 g de alecrim/kg de ração, 0,45 mg/Kg de MDA para o tratamento que recebeu 10 g de folhas de oliveira/kg de ração e 1,25 mg/Kg de MDA para o tratamento controle. Os valores de TBARs no estudo de Govaris et al., (2010) foram superiores ao deste estudo aos 12 dias, onde encontrou-se 0,245 mg/Kg de MDA para o tratamento que recebeu 10 g de folhas de oliveira/kg de ração. Gök &

Bor (2012) avaliaram o efeito de extrato de folhas de oliveira sobre a conservação de almondegas resfriadas e obtiveram redução dos valores de TBARs.

A carne de frango quando enriquecida com PUFA contém muitos ácidos graxos com elevado número de ligações duplas, aumentando sua susceptibilidade à oxidação lipídica (MARASCHIELLO, SARRAGA & GARCIA-REGUEIRO, 1999; GRAU et al, 2001). Este comportamento foi verificado no 7º dia para T1, com 22,15% de ácidos graxos poli-insaturados e 0,062 mg/MDA kg de amostra e no 12º dia para T3, com 23,301% de ácidos graxos poli-insaturados 0,245 mg/MDA kg de amostra, demonstrando que os tratamentos com maiores valores de ácidos graxos poli-insaturados teve maiores valores para o TBARs.

A oxidação proteica avaliada através das proteínas carboniladas (Tabela 10), indicou valores de 1,235, 1,015 e 0,973 nmol/mg para T1, T2 e T3, respectivamente após o primeiro dia de estocagem a 4°C. As folhas de oliveira promoveram retardo do início da oxidação proteica, porém, sem diferença significativa em relação a T1. Os valores de proteínas carboniladas aos 12 dias foram de 0,818, 0,937 e 0,921 nmol/mg para T1, T2 e T3, respectivamente, menores do que os encontrados por RABABAH et al., (2004) de 2,7 nmol/mg proteína em carne de frango após estocagem por 12 dias em temperatura resfriada.

A análise dos aminoácidos presentes nas coxas e sobrecoxas dos tratamentos está apresentada na Tabela 11. O Tratamento 1 apresentou quantidades significativamente maiores ($P < 0,05$) de ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina, leucina e arginina em relação a T2 e T3. Os aminoácidos mais susceptíveis à oxidação proteica, segundo Stadtman (1992) são cistina, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina, prolina, arginina, lisina e metionina. Com exceção da prolina para T2 e da metionina para T3, foi observada redução no conteúdo destes aminoácidos para os tratamentos que receberam adição de folhas de oliveira na dieta em relação a T1, indicando que as folhas de oliveira adicionadas via dieta podem ter influenciado na absorção destes aminoácidos pelos frangos.

Tabela 11 - Valores médios de aminoácidos das coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 12 dias.

Aminoácidos (g/100g)	Tratamentos					
	T1		T2		T3	
ácido aspártico	1,690 ^a	($\pm 0,010$)	1,510 ^c	($\pm 0,030$)	1,570 ^b	($\pm 0,007$)
ácido glutâmico	2,580 ^a	($\pm 0,010$)	2,380 ^c	($\pm 0,010$)	2,450 ^b	($\pm 0,006$)
alanina	1,070 ^a	($\pm 0,010$)	1,020 ^b	($\pm 0,010$)	0,960 ^c	($\pm 0,010$)
arginina	1,170 ^a	($\pm 0,010$)	1,140 ^b	($\pm 0,006$)	1,070 ^c	($\pm 0,005$)
fenilalanina	0,725 ^a	($\pm 0,001$)	0,659 ^c	($\pm 0,046$)	0,684 ^b	($\pm 0,001$)
glicina	0,942 ^b	($\pm 0,002$)	1,090 ^a	($\pm 0,010$)	0,758 ^c	($\pm 0,001$)
histidina	0,537 ^a	($\pm 0,002$)	0,441 ^c	($\pm 0,001$)	0,495 ^b	($\pm 0,001$)
isoleucina	0,846 ^a	($\pm 0,001$)	0,737 ^c	($\pm 0,001$)	0,795 ^b	($\pm 0,001$)
leucina	1,430 ^a	($\pm 0,010$)	1,260 ^c	($\pm 0,010$)	1,360 ^b	($\pm 0,015$)
lisina	1,570 ^a	($\pm 0,015$)	1,390 ^c	($\pm 0,010$)	1,510 ^b	($\pm 0,006$)
prolina	0,755 ^b	($\pm 0,001$)	0,830 ^a	($\pm 0,010$)	0,656 ^c	($\pm 0,001$)
serina	0,750 ^a	($\pm 0,013$)	0,680 ^c	($\pm 0,009$)	0,698 ^b	($\pm 0,001$)
tirosina	0,578 ^a	($\pm 0,001$)	0,533 ^c	($\pm 0,001$)	0,562 ^b	($\pm 0,001$)
treonina	0,824 ^a	($\pm 0,001$)	0,741 ^c	($\pm 0,001$)	0,774 ^b	($\pm 0,001$)
valina	0,855 ^a	($\pm 0,001$)	0,739 ^c	($\pm 0,003$)	0,803 ^b	($\pm 0,001$)
triptofano	0,229 ^a	($\pm 0,002$)	0,180 ^b	($\pm 0,001$)	0,229 ^b	($\pm 0,002$)
cistina	0,198 ^a	($\pm 0,001$)	0,175 ^c	($\pm 0,001$)	0,188 ^b	($\pm 0,002$)
metionina	0,515 ^b	($\pm 0,001$)	0,443 ^c	($\pm 0,002$)	0,521 ^a	($\pm 0,001$)

Nota 1: a,b,c são analisadas na horizontal. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

De acordo com Bressan (1998); Mendes, Moreira & Garcia, (2003), a CRA tem influência sobre o aspecto, palatabilidade e perda de água da carne durante o cozimento. A CRA avaliada nas coxas e sobrecoxas de frango (Tabela 12) indicou valores significativamente maiores ($P < 0,05$) para os tratamentos que receberam adição de folhas de oliveira via dieta em relação ao tratamento que recebeu dieta convencional, no 7° e 12° dia de armazenamento a 4°C.

A CRA é frequentemente afetada pelo pH e pela interação das proteínas da carne com a água, porém quando atinge o ponto isoelétrico (pI) das proteínas, ocorre uma diminuição na CRA. O pI das proteínas da carne está entre os pH de 5,3 a 5,9. Os resultados para as coxas e

sobrecoxas de T1, T2 e T3 indicaram que quanto maior o valor de pH (Tabela 8) menor foi a CRA da amostra (Tabela 12).

Durante o armazenamento a carne apresenta tendência de exsudação, o que é indesejável sob o ponto de vista do consumidor, em função do aspecto limoso conferido, e sob o ponto de vista tecnológico, em virtude da liberação de líquido, proteínas miofibrilares e hemoglobina. Com relação à perda de exsudato durante a refrigeração das coxas e sobrecoxas de frango, quando submetidas ao processo de refrigeração, após o abate, observou-se que entre o pH de 5,80 a 5,90 (Tabela 8) ocorre a menor perda de exsudato, coincidindo com o pH de maior capacidade de retenção de água descrito na análise de centrifugação. Este comportamento foi verificado para os tratamentos T1, T2 e T3 no 1º dia, T2 e T3 no 7º dia e para T3 no 12º dia (tabela 12). ROQUE-SPECHT et al.; (2009) ao avaliarem a exsudação em peitos de frango em função do pH final do produto também encontraram menor perda de exsudato em pH entre 5,6 e 5,8, e estes valores coincidiram com o pH de maior capacidade de retenção de água dos peitos de frango.

Tabela 12 - Valores de CRA e exsudação em coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 12 dias.

Parâmetros		Período de análise		
		1	7	12
Exsudação (%)	T1	1,087 ^a	1,280 ^a	1,373 ^a
		($\pm 0,076$)	($\pm 0,070$)	($\pm 0,061$)
	T2	1,103 ^a	1,193 ^b	1,290 ^a
		($\pm 0,036$)	($\pm 0,050$)	($\pm 0,046$)
	T3	0,830 ^b	1,153 ^b	1,170 ^b
		($\pm 0,055$)	($\pm 0,055$)	($\pm 0,053$)
CRA (%)	T1	19,200 ^b	19,860 ^b	20,550 ^b
		($\pm 0,001$)	($\pm 0,001$)	($\pm 0,001$)
	T2	19,670 ^b	20,320 ^a	21,190 ^a
		($\pm 0,001$)	($\pm 0,001$)	($\pm 0,001$)
	T3	20,310 ^a	20,630 ^a	21,730 ^a
		($\pm 0,001$)	($\pm 0,001$)	($\pm 0,001$)

Nota 1: a,b,c são analisadas na vertical. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

As coxas e sobrecoxas dos tratamentos de frangos que receberam ração suplementada com folhas de oliveira (T2 e T3) apresentaram menor exsudação em relação a T1 (Tabela 12). O tratamento que recebeu adição de 10g de folhas de oliveira/kg de ração e teve pH variando entre 5,8 e 5,9 apresentou exsudação abaixo de 1,2% durante os 12 dias de armazenamento a 4°C, indicando que as folhas de oliveira exercem efeito positivo sobre este parâmetro que é indesejável do ponto de vista do consumidor.

A Figura 8 apresenta a coloração das coxas e sobrecoxas de frango com exposição à luz natural.

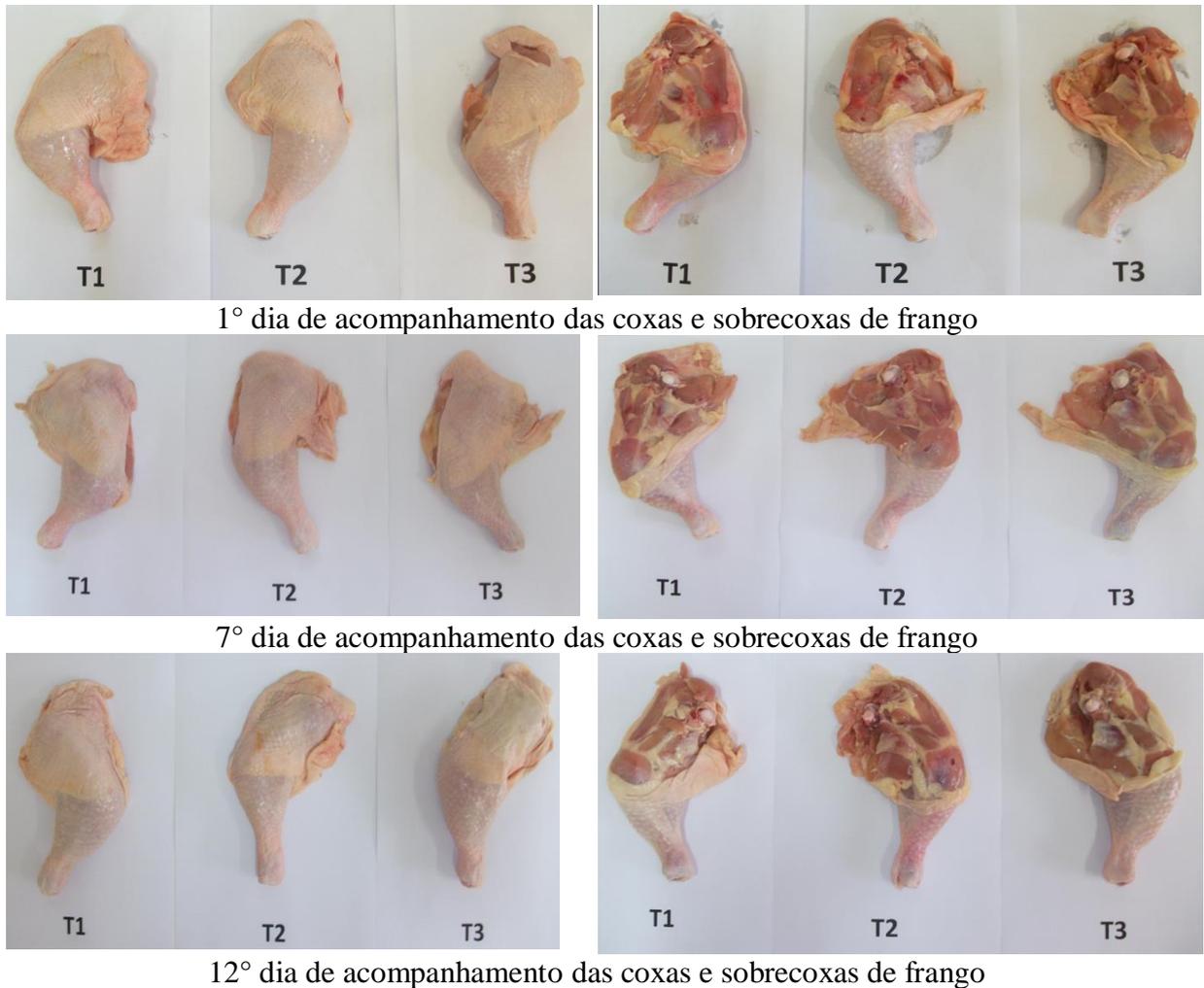


Figura 8 - Fotografia das coxas e sobrecoxas armazenadas resfriadas expostas à luz natural, obtida em resolução de 7,2 megapixels e qualidade de impressão 600 dpi.

A determinação objetiva de cor apresentada na Tabela 13 expressa os valores de L*, a* e b* para as coxas e sobrecoxas de frango respectivamente. Para o valor L*, que representa a luminosidade da amostra, quanto maior o seu valor, mais clara será a amostra. O parâmetro a* indica a intensidade da cor vermelha; ou seja, quanto maior esse valor mais vermelha será a amostra. O parâmetro b* indica a intensidade da cor amarela, que para carnes e seus derivados está relacionada com a cor marrom (BARRETO, 2007). A análise de cor das coxas e sobrecoxas de frangos apresentada na Tabela 13 indicou não haver diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os 3 tratamentos durante os 12 dias de acompanhamento. Este resultado é indicativo de que as folhas de oliveira adicionadas via dieta não promoveram alterações de coloração nas coxas e sobrecoxas dos frangos de T2 e T3 em relação ao tratamento que recebeu dieta convencional (T1).

Tabela 13 - Valores médios de Cor (L*, a*, b*) das coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 12 dias.

Parâmetros	Período de estocagem (dias)								
	1			7			12		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
L* - coxas	57,58 ^a ($\pm 2,00$)	56,15 ^a ($\pm 1,48$)	56,69 ^a ($\pm 2,44$)	81,81 ^a ($\pm 1,42$)	79,84 ^a ($\pm 1,30$)	78,91 ^b ($\pm 1,82$)	83,14 ^a ($\pm 11,80$)	71,46 ^a ($\pm 1,25$)	76,88 ^a ($\pm 1,42$)
a* - coxas	17,31 ^a ($\pm 1,70$)	13,45 ^a ($\pm 1,36$)	14,37 ^a ($\pm 2,12$)	9,19 ^a ($\pm 1,59$)	6,03 ^a ($\pm 2,49$)	6,57 ^a ($\pm 1,90$)	9,19 ^a ($\pm 4,03$)	6,03 ^a ($\pm 1,85$)	6,57 ^a ($\pm 2,25$)
b* - coxas	8,57 ^b ($\pm 1,43$)	15,66 ^a ($\pm 3,28$)	14,24 ^a ($\pm 1,36$)	10,81 ^a ($\pm 3,25$)	4,68 ^a ($\pm 4,79$)	4,05 ^a ($\pm 2,45$)	5,16 ^a ($\pm 0,61$)	3,22 ^a ($\pm 1,86$)	2,55 ^a ($\pm 1,26$)
L* - sobrecoxas	54,56 ^a ($\pm 0,97$)	52,78 ^a ($\pm 1,73$)	54,40 ^a ($\pm 2,93$)	77,34 ^a ($\pm 2,10$)	74,54 ^a ($\pm 1,54$)	75,37 ^a ($\pm 1,41$)	83,14 ^a ($\pm 11,80$)	71,46 ^a ($\pm 1,25$)	76,88 ^a ($\pm 1,42$)
a* - sobrecoxas	13,95 ^a ($\pm 1,15$)	16,76 ^a ($\pm 0,65$)	15,90 ^a ($\pm 2,36$)	7,73 ^a ($\pm 1,15$)	9,60 ^a ($\pm 1,13$)	8,54 ^a ($\pm 2,52$)	6,84 ^a ($\pm 5,19$)	12,51 ^a ($\pm 0,41$)	9,16 ^a ($\pm 1,35$)
b* - sobrecoxas	10,42 ^a ($\pm 2,07$)	11,77 ^a ($\pm 1,75$)	12,20 ^a ($\pm 0,46$)	3,61 ^a ($\pm 2,25$)	1,02 ^a ($\pm 0,54$)	0,83 ^a ($\pm 0,50$)	2,78 ^a ($\pm 3,41$)	2,72 ^a ($\pm 1,80$)	1,81 ^a ($\pm 1,537$)

Nota: a,b,c são analisadas na horizontal. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

5.4 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS COXAS E SOBRECoxAS ARMAZENADAS RESFRIADAS

Na Figura 9 é apresentado o número de colônias (\log_{10} UFC/g) de bactérias aeróbias mesófilas (BAM), bactérias ácido lácticas (BAL), bactérias aeróbias psicotróficas (BAP) e bactérias *pseudomonas* (BP) avaliadas por 12 dias.

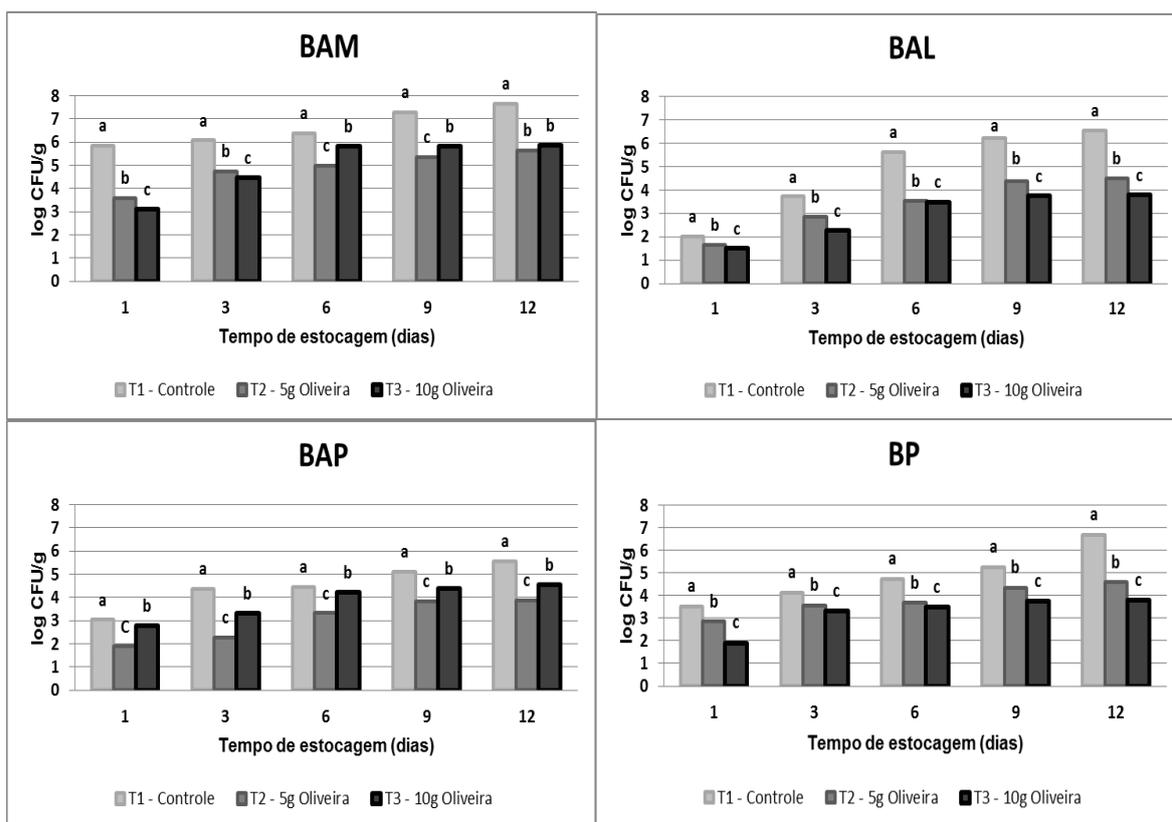


Figura 9 - Número de colônias (\log_{10} UFC/g) de bactérias aeróbias mesófilas (BAM), bactérias ácido lácticas (BAL), bactérias aeróbias psicotróficas (BAP) e bactérias *pseudomonas* (BP), em coxas e sobrecoxas de frangos armazenadas a 4°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 12 dias.

Nota 1: a,b,c são analisadas entre T1, T2 e T3 por intervalo de análise. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

Em frangos resfriados, o número de colônias dos micro-organismos aeróbios mesófilos indica condições de higiene no processo, pois seu habitat são às penas, pele, pés e cloaca. Durante o abate dos frangos pode unir-se a esse grupo micro-organismos presentes no sistema digestivo, quando o processo tecnológico não é adequado (RITTER & BERGMANN,

2003). É estabelecido o número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas de $7 \log_{10}$ UFC/g como indicador do fim da vida útil da carne de frango resfriada (IFST,1999). Alguns estudos são mais criteriosos considerando fora das condições higiênico-sanitárias ideais frangos que ultrapassam o número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas $6 \log_{10}$ UFC/g (RITTER & BERGMANN, 2003).

O número de colônias de aeróbios mesófilos (Figura 9, BAM), nos tratamentos que receberam dieta suplementada com folhas de oliveiras (T2 e T3), mantiveram-se dentro dos padrões de qualidade até o 12º dia, uma vez que o número de colônias máximo aceitável foi de 5,63 e 5,87 \log_{10} UFC/g, respectivamente, enquanto que no tratamento controle o número de colônias foi de 6,07 \log_{10} UFC/g a partir do 3º dia de armazenamento. Em todos os dias analisados o número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas dos tratamentos T2 e T3 (Figura 9, BAM) diferiram significativamente ($P < 0,05$) do número encontrado no tratamento controle. Entre T2 e T3 também ocorreu diferença significativa ($P < 0,05$) até o 9º dia. Em virtude do número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas fornecer uma estimativa da população microbiana total e um número elevado estar relacionado à baixa qualidade e reduzida vida de prateleira do alimento, pode-se dizer que os tratamentos de frangos com folhas de oliveira adicionadas na dieta (T2 e T3) proporcionaram aumento na vida de prateleira das coxas e sobrecoxas armazenadas sob resfriamento a 4°C, decorrente de no 12º dia de armazenamento o número de colônias ser 5,63 (T2) e 5,87 \log_{10} UFC/g (T3).

O número de colônias de bactérias ácido lácticas (Figura 9, BAL) nos tratamentos com folhas de oliveiras variou de 1,64 a 4,49 \log_{10} UFC/g para T2 e de 1,50 a 3,77 \log_{10} UFC/g para T3, sendo significativamente menor que o tratamento controle (T1 de 2,00 a 6,54 \log_{10} UFC/g) durante os 12 dias. T3 em todos os dias analisados apresentou número significativamente menor de colônias em relação a T2. Este resultado pode ser devido à oleuropeína, principal componente das folhas de oliveira, indicada como positiva na ação contra bactérias ácido lácticas (RUIZ-BARBA et al., 1990; Ruiz-BARBA, GARRIDO-FERNANDEZ & JIMENEZ-DIAZ, 1991), estar presente em maior percentual em T3. Botsoglou et al., (2010), adicionaram 5 e 10g de folhas de oliveira/kg na ração de perus, e avaliaram o crescimento microbiano nos filés de peito armazenados a 4°C por 12 dias. No 12º dia o número de colônias de bactérias ácido lácticas no tratamento controle foi de $6,5 \log_{10}$ UFC/g, e nos tratamentos com 10 e 5g de folhas de oliveiras foram de 4 e 5 \log_{10} UFC/g respectivamente. Neste estudo o número de colônias de bactérias ácido lácticas nas coxas e sobrecoxas no 12º dia foram de 3,77 e 4,49 \log_{10} UFC/g para os tratamentos T3 e T2

respectivamente, sendo esses valores menores do que os encontrados por Botsoglou et al., (2010) no mesmo tempo de armazenamento e na mesma temperatura.

Embora o número de colônias de micro-organismos aeróbios psicrotróficos indique o grau de deterioração de alimentos refrigerados, a legislação brasileira não estabelece padrão para estes micro-organismos. Entretanto, a *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF, 1986) estabelece de 6 e 7 \log_{10} UFC/g como padrão. A alteração da carne refrigerada em aerobiose é um fenômeno de superfície, e caracteriza-se por apresentar um alto número de colônias de bactérias e mudanças sensoriais devido aos metabólitos resultantes do crescimento dessas bactérias (odores anômalos, normalmente desagradáveis, e aparecimento de substâncias viscosas, como polissacarídeos sintetizados pelas bactérias) (GALARZ, FONSECA & PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2010). As coxas e sobrecoxas dos frangos pertencentes a T2 e T3 apresentaram durante todo o período analisado, número máximo de colônias de bactérias psicrotróficas de 3,87 e 4,55 \log_{10} UFC/g respectivamente (Figura 7, BAP), estando às coxas e sobrecoxas aptas para consumo e sem o aparecimento de odores e viscosidade em sua superfície, demonstrando bom efeito das folhas de oliveiras via dieta frente a esse grupo de bactérias. Durante os 12 dias T2 (5g de folhas de oliveiras) apresentou menor número de colônias de bactérias psicrotróficas, diferindo significativamente ($P < 0,05$) de T3 (10g de folhas de oliveiras), e de T1 (controle). O número de colônias de T3 foi menor do que o encontrado em T1 (controle), diferindo-se significativamente ($P < 0,05$) deste. Em filés de peito de perus que receberam folhas de oliveiras na dieta, Botsoglou et al. (2010), encontraram número de colônias de bactérias aeróbias psicrotróficas no 12º dia de armazenamento de 4,6 e 5,7 \log_{10} UFC/g nos perus que receberam 10 e 5 g de folhas de oliveira/kg de ração, sendo esses maiores do que os encontrados neste estudo, que foram de 4,55 para T3 e 3,87 \log_{10} UFC/g para T2.

O número de colônias de *Pseudomonas* spp., é definida pela IFST (1999) como indicativo de término de vida útil quando atinge valores de 5 a 7 \log_{10} UFC/g. O número de colônias de *Pseudomonas* dos tratamentos T2 e T3 foram menores do que 5 \log_{10} UFC/g durante os 12 dias de armazenamento, não apresentando sinais de deterioração e estando apropriados para o consumo. Os tratamentos T2 e T3 apresentaram número de colônias de *Pseudomonas* significativamente menores ($P < 0,05$) do que o encontrado em T1 (controle), em todos os dias analisados. Foi verificada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos T2 e T3 durante todo o período estudado, indicando que a suplementação de 10g de folhas de oliveira por kg de ração apresentou melhor efeito antimicrobiano. Esses resultados são

importantes uma vez que espécies de *Pseudomonas* são predominantes em carne de frango deterioradas, e estão relacionadas a produção de uma ampla variedade de odores e sabores, devido à ação de suas enzimas lípases e proteases (MELLOR, BENTLEY & DYKES, 2011). Pereira et al., (2007) também verificou efeito positivo do extrato de folhas de oliveira frente *Pseudomonas*.

A carne dos frangos que receberam folhas de oliveira na dieta apresentou número de colônias de aeróbias mesófilas, bactérias lácticas, aeróbias psicotróficas e *Pseudomonas* significativamente ($p < 0,05$) menores do que os encontrados no tratamento controle. Esses resultados demonstram efeito positivo da oliveira frente microorganismos deteriorantes, uma vez que são as bactérias psicotróficas e especialmente as *Pseudomonas* que deterioram as carcaças de frango durante o período de armazenamento e influenciam na determinação da vida de prateleira dos cortes (MIYAGUSKU et al., 2003). Gök & Bor (2012) também verificaram efeito positivo das folhas de oliveira frente aeróbias mesófilas, *Pseudomonas* e Psicotróficas em almôndegas armazenadas refrigeradas.

A presença de coliformes totais é considerada uma indicação útil de contaminação pós-sanitização ou pós-processo, evidenciando práticas de higiene e sanitização aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimento (SILVA et al., 2007). A carne de frango que recebeu dieta suplementada com folhas de oliveira em ambas as concentrações, apresentou valores de contagens de coliformes totais significativamente menores que o tratamento controle durante os 12 dias de estocagem (Figura 10, CTO). Botsoglou et al., (2010) também obteve redução significativa de coliformes totais na carne de peru que recebeu dieta com folhas de oliveira em relação ao controle e Ahmed et al., (2014) obteve redução de coliformes totais com o uso de extrato de folhas de oliveira em camarão.

Coliformes termotolerantes é indicativa de contaminação fecal, com possível presença de bactérias patogênicas (FLORENTINO, LEITE & AS, 1997). A Resolução nº 12/2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, preconiza para cortes de frango resfriados ou congelados o limite de tolerância para o número de colônias de coliformes termotolerantes de $4 \log_{10}$ UFC/g (BRASIL, 2001). Após o abate, T1 apresentou número de colônias de coliformes termotolerantes ($4,5 \log_{10}$ UFC/g) maior do que o limite permitido pela Resolução nº 12/2001 (Figura 10 CTE) estando impróprio para o consumo, e nos outros dias analisados esse número aumentou. Os tratamentos T2 ($1,93 \log_{10}$ UFC/g) e T3 ($2,36 \log_{10}$ UFC/g) apresentaram número de colônias abaixo do limite permitido pela Resolução até o 6º dia de armazenamento diferindo significativamente ($P < 0,05$) do Tratamento 1 (Figura 10, CTO).

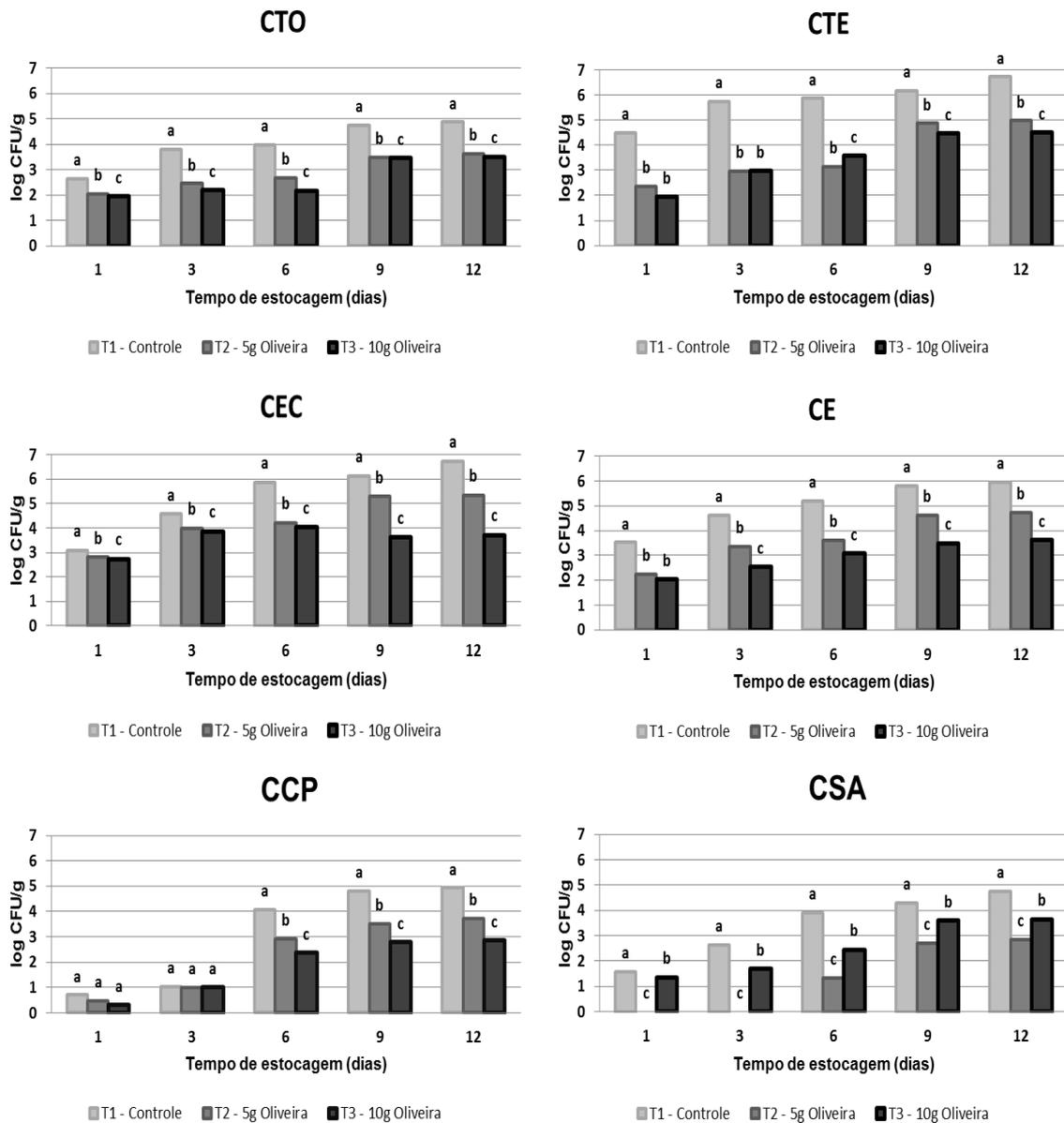


Figura 10 - Número de colônias (\log_{10} UFC/g) de Coliformes Totais (CTO), Coliformes Termotolerantes (CTE), *Escherichia coli* (CEC), *Enterococcus* spp (CE), *Clostridium perfringens* (CCP) e *Staphylococcus aureus* (CSA) em coxas e sobrecoxas de frangos armazenadas a 4°C por 12 dias.

Nota 1: a,b,c são analisadas entre T1, T2 e T3 por intervalo de análise. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

A *Escherichia coli* é a espécie predominante entre os diversos micro-organismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente.

Sua presença nos alimentos indica contaminação microbiana de origem fecal e, portanto condições higiênicas insatisfatórias sendo diversas linhagens patogênicas (FRANCO & LANDGRAF, 2008). A presença de *Escherichia coli* (Figura 10, CEC) iniciou com valores próximos entre os três tratamentos 3,07, 2,79 e 2,73 log CFU/g para T1, T2 e T3 respectivamente. Aos 9 e 12 dias T2 e T3 tiveram reduções significativas ($P < 0,05$) das contagens em relação a T1, demonstrando efeito positivo da oliveira frente este grupo de micro-organismo, e maior sensibilidade a quantidade de 5g de oliveira/kg de ração. Pereira et al., (2007) e Gökmen et al., (2014) também obtiveram efeito positivo do extrato das folhas de oliveira frente *Escherichia coli*.

O gênero *Enterococcus* spp. em carcaças de frangos pode ser indicador de higiene, e contaminação fecal, sendo justificado pelo fato de algumas espécies de bactérias serem mais tolerantes à refrigeração, e sobreviverem por mais tempo durante o armazenamento, quando comparadas com a *Escherichia coli* e outros coliformes, entretanto, não há um nível estabelecido para relacionar a presença de *Enterococcus* spp. e a qualidade higiênica de um determinado produto (INGHAM & SCHMIDT, 2000). As coxas e sobrecoxas de frangos que receberam folhas de oliveiras na dieta (T2 e T3), apresentaram efeito antimicrobiano em relação a T1 durante o período estudado em relação ao gênero *Enterococcus* spp. Constatou-se que em relação ao gênero *Enterococcus* spp. T3 apresentou efeito inibitório superior a T2 durante os 12 dias de acompanhamento, onde ao final do acompanhamento verificou-se valores de 3,61, 4,71 e 5,94 log₁₀ UFC/g para T3, T2 e T1, respectivamente (Figura 10, CE).

O uso de folhas de oliveira na quantidade de 10g/kg de ração indicou melhor efeito inibitório que o uso de 5g/kg de ração para *Clostridium perfringens*, mas ambas as quantidades demonstram capacidade inibitória significativamente ($P < 0,05$) melhor que T1 do sexto aos doze dias de acompanhamento (Figura 10, CCP).

A legislação vigente no Brasil não estabelece padrão para *Staphylococcus aureus* em carne de frango, no entanto, há relatos que com número de colônias entre 5 log₁₀ e 6 log₁₀ UFC/g, teríamos produção de toxina capaz de provocar intoxicação (FRANCO & LANDGRAF, 2008). Considerando este padrão, e analisando o crescimento na Figura 10 - CSA, pode-se dizer que durante os 12 dias de armazenamento a 4°C, T2 e T3 apresentaram contagens significativamente menores ($P < 0,05$) que o controle, o que é indicativo de condições mais seguras para o consumo da carne de frango em relação a este micro-organismo. As contagens máximas foram de 2,84, 3,64 e 4,74 log₁₀UFC/g para T2, T3 e T1, respectivamente. A inibição de *Staphylococcus aureus* foi significativamente ($P < 0,05$) maior

para o tratamento que recebeu adição de 5g de oliveira/kg de ração em relação a T1 e T3. Com 12 dias a diferença entre T3 e T1 foi de 1,1 log₁₀ UFC/g, demonstrando melhor efeito inibitório da oliveira nesta concentração.

A legislação federal estabelece para carne de ave resfriada ausência de *Salmonella* spp. em 25 g. Em todos os dias analisados e em todos os tratamentos não foi evidenciada a presença de *Salmonella* spp.

A bactéria *Listeria monocytogenes* é um patógeno psicotrófico transportado por alimentos, que pode causar sérias doenças em humanos (FARBER & PETERKIN, 1991; RYSER & MARTH, 1991), podendo crescer em temperatura mínima média de 1°C, demonstrando capacidade de desenvolver-se em carne refrigerada (MURIANA, 1996). As amostras de coxas e sobrecoxas pertencentes aos três Tratamentos apresentaram ausência de *Listeria monocytogenes* durante os 12 dias de armazenamento a 4°C, ocorrendo o mesmo comportamento para *Campylobacter*, *Shigella*, *Klebsiela*, *Yersinia*, *Streptococcus*.

5.5 AVALIAÇÃO SENSORIAL DAS COXAS E SOBRECOXAS ARMAZENADAS RESFRIADAS

A pré-seleção da equipe de degustadores foi realizada pelo teste triangular, onde dos 20 degustadores que participaram, 12 obtiveram um mínimo de 80% de acertos no total do teste de rede, e foram recrutados pois também demonstraram ter interesse e disponibilidade no período de realização da análise das coxas e sobrecoxas de frango.

Com auxílio de um líder, os provadores selecionados realizaram levantamento de atributos sensoriais e chegaram a um consenso resultando na lista consensual de termos apresentada na Tabela 14.

Tabela 14 - Lista consensual de termos descritivos obtidos pela avaliação dos degustadores.

Atributos	Definições
Aspecto	
Intensidade da cor verde	Refere-se a intensidade da cor verde
Brilho	Refere-se ao brilho da superfície das coxas e sobrecoxas de frango
Cor	
Cor clara	Refere-se a coloração clara das amostras
Cor amarelada	Refere-se a coloração amarelada da gordura e pele de frango
Cor esverdeada	Refere-se a coloração esverdeada das amostras
Odor	
Odor de frango	Refere-se ao odor de frango das amostras
Odor de azeite de oliva	Refere-se ao odor de azeite de oliva das amostras
Odor de ranço	Refere-se ao odor ranço das amostras
Textura	
Suculenta	Refere-se a suculência das amostras
Rígida	Refere-se a rigidez das amostras
Sabor	
Frango fresco	Refere-se ao gosto de carne fresca de frango
Ácido	Refere-se ao gosto ácido
Azeite de oliva	Refere-se ao gosto de azeite de oliva
ranço	Refere-se ao gosto de ranço

5.5.1 Análise descritiva quantitativa das coxas e sobrecoxas armazenadas resfriadas

O perfil sensorial dos três tratamentos no 1º dia de avaliação está apresentado graficamente na Figura 11, onde o valor médio atribuído pelos provadores a cada termo descritor é marcado no eixo correspondente e o centro do gráfico representa o ponto zero da escala utilizada na avaliação, enquanto a intensidade aumenta do centro para a periferia.

Para os atributos odor de ranço e sabor de ranço, conforme resultados apresentados na Figura 11, pode-se visualizar que os tratamentos que receberam adição de folhas de oliveira (T2 e T3) apresentaram os menores valores, enquanto T1 recebeu as maiores notas. Os resultados para T2 foram menores que T3 (Tabela 15, 1º dia) e esta diferença de percepção dos atributos pelos degustadores é indicativa de melhor retardo da oxidação lipídica pelos frangos provenientes do Tratamento 2 (5g de folhas de oliveira/kg de ração), sendo que estes resultados estão relacionados aos valores de oxidação lipídica avaliados através das análises de dienos conjugados índice de peróxidos e TBARs (Tabela 10), as quais também indicaram

menores valores de oxidação lipídica para T2. Houve diferença significativa ($P<0,05$) entre T2 e T3 e o Tratamento 1 conforme apresentado na Tabela 15, 1º dia.

Para os atributos sabor e odor de azeite de oliva os degustadores atribuíram notas altas para T2 e T3, sendo estes significativamente ($P<0,05$) maiores que T1, indicando que a incorporação de oliveira na ração da dieta dos frangos contribuiu para a modificação do sabor e odor da carne das coxas e sobrecoxas conferindo notas sensoriais que não foram percebidas no Tratamento 1 (controle).

O aspecto das coxas e sobrecoxas avaliado pelos atributos intensidade da cor verde e brilho, indicou maiores resultados para T3 para o atributo brilho, sendo estes significativamente ($P<0,05$) diferentes de T1, indicando que a adição de oliveira pode contribuir para melhorar a característica de brilho das coxas e sobrecoxas de frango. Para intensidade da cor verde, T2 e T3 tiveram valores significativamente ($P<0,05$) maiores que o T1, (Tabela 15, 1º dia), indicando que a adição de oliveira via dieta proporcionou alteração na coloração da carne. Analisando as notas atribuídas aos tratamentos pelos degustadores (Figura 11), nota-se que quanto maior o percentual de adição de oliveira na ração, maior foi a intensidade da coloração verde nas coxas e sobrecoxas de frango.

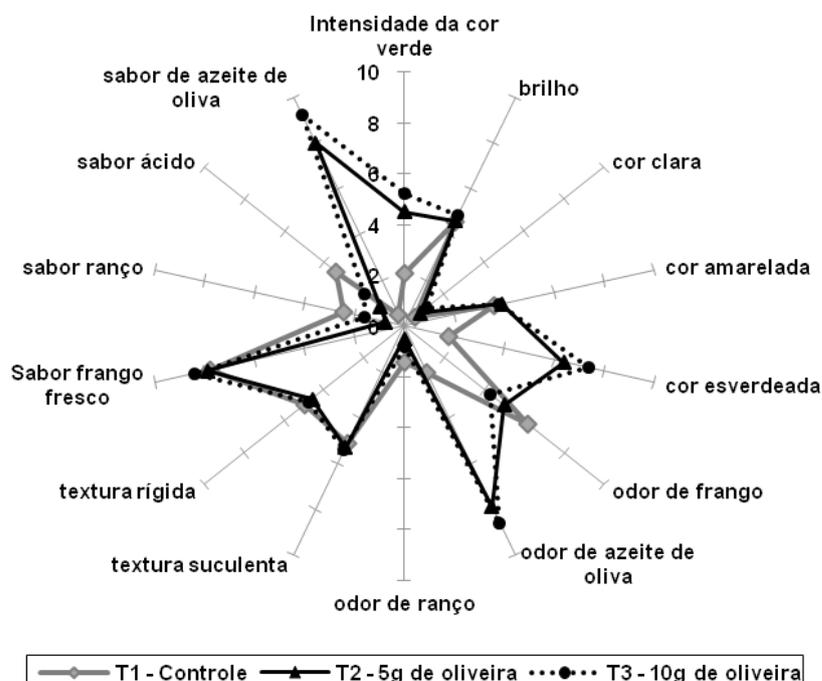


Figura 11 - Valores médios da análise de ADQ das coxas e sobrecoxas dos Tratamentos T1(Controle), T2 (5g de oliveira) e T3 (10g de oliveira), no 1º dia de armazenamento a 4°C (± 1).

Tabela 15 - Valores médios da análise de ADQ das coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a 4°C (±1).

Atributos avaliados	Intervalo de Análise					
	1º dia de Avaliação			12º dia de Avaliação		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Intensidade da cor verde	2,1 ^c	4,367 ^b	5,233 ^a	4,603 ^a	3,063 ^c	3,14 ^b
brilho	(± 0,100)	(± 0,058)	(± 0,153)	(± 0,006)	(± 0,015)	(± 0,010)
cor clara	4,533 ^c	4,567 ^b	4,813 ^a	3,767 ^a	3,48 ^c	3,737 ^b
cor amarelada	(± 0,006)	(± 0,058)	(± 0,006)	(± 0,115)	(± 0,010)	(± 0,006)
cor esverdeada	0,543 ^c	0,817 ^b	1,133 ^a	2,3 ^a	2,4 ^a	1,9 ^b
odor de frango	(± 0,006)	(± 0,006)	(± 0,153)	(± 0,100)	(± 0,100)	(± 0,100)
odor de azeite de oliva	3,6 ^b	3,867 ^a	3,8 ^a	4,667 ^a	4,383 ^b	4,753 ^a
odor de ranço	(± 0,100)	(± 0,115)	(± 0,100)	(± 0,058)	(± 0,015)	(± 0,006)
textura succulenta	1,733 ^c	6,4 ^b	7,333 ^a	3,8 ^a	2,4 ^c	3,207 ^b
textura rígida	(± 0,058)	(± 0,100)	(± 0,058)	(± 0,100)	(± 0,100)	(± 0,006)
Sabor frango fresco	6,2 ^a	4,967 ^b	4,3 ^c	4,377 ^c	4,847 ^a	4,647 ^b
sabor ranço	(± 0,100)	(± 0,058)	(± 0,100)	(± 0,012)	(± 0,006)	(± 0,006)
sabor ácido	0,083 ^c	7,833 ^b	8,637 ^a	0,183 ^c	2,46 ^b	5,483 ^a
sabor de azeite de oliva	(± 0,100)	(± 0,153)	(± 0,064)	(± 0,076)	(± 0,010)	(± 0,015)
	1,4 ^a	0,5 ^c	0,8 ^b	4,65 ^a	1,2 ^c	1,483 ^b
	(± 0,100)	(± 0,100)	(± 0,100)	(± 0,010)	(± 0,100)	(± 0,012)
	5,073 ^b	5,283 ^{a,b}	5,4 ^a	5,567 ^c	6,337 ^b	6,6 ^a
	(± 0,064)	(± 0,015)	(± 0,100)	(± 0,115)	(± 0,006)	(± 0,100)
	4,977 ^a	4,6 ^b	4,767 ^{a,b}	5,507 ^a	4,767 ^b	4,427 ^c
	(± 0,015)	(± 0,100)	(± 0,058)	(± 0,012)	(± 0,153)	(± 0,006)
	7,767 ^b	7,9 ^b	8,367 ^a	5,417 ^c	6,233 ^b	6,513 ^a
	(± 0,058)	(± 0,100)	(± 0,058)	(± 0,015)	(± 0,006)	(± 0,015)
	2,413 ^a	0,767 ^c	1,57 ^b	7,833 ^a	3,067 ^c	3,433 ^b
	(± 0,012)	(± 0,021)	(± 0,010)	(± 0,058)	(± 0,006)	(± 0,115)
	3,413 ^a	1,167 ^c	1,97 ^b	4,633 ^a	3,067 ^c	3,467 ^b
	(± 0,115)	(± 0,058)	(± 0,061)	(± 0,252)	(± 0,058)	(± 0,058)
	0,5 ^c	7,967 ^b	9,167 ^a	0,1 ^c	2,837 ^b	4,367 ^a
	(± 0,100)	(± 0,058)	(± 0,058)	(± 0,100)	(± 0,012)	(± 0,012)

Nota 1: a,b,c são analisadas na horizontal entre T1, T2 e T3 por intervalo de análise. Letras diferentes apresentam diferença significativa (P<0,05) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

O aumento da intensidade da cor verde que as folhas de oliveira conferiram à carne de frango de acordo com Taamalli (2012) deve-se a presença de clorofila, que pode estar presente em concentrações de 1 a 10 mg/kg de folhas, podendo variar de acordo com a variedade, grau de maturidade, método de extração e fatores técnicos e biológicos. A clorofila é o pigmento dominante das folhas de oliveira, presente na concentração de 70 a 80%, seguida dos carotenoides. Estes pigmentos responsáveis pela coloração das folhas de oliveira estão envolvidos em mecanismos de auto oxidação e foto oxidação, o que justifica a melhoria

significativa dos atributos de odor e sabor de ranço e cor esverdeada na carne de coxas e sobrecoxas que receberam folhas de oliveira.

Para o atributo coloração, as coxas e sobrecoxas foram avaliadas quanto à intensidade de cor clara, amarela e verde. A coloração verde teve maior intensidade nas coxas e sobrecoxas dos frangos que receberam adição de oliveira na dieta (Tabela 15, 1º dia), T2 e T3 diferiram significativamente de T1. A coloração da pele das coxas e sobrecoxas dos frangos foi avaliada pelo atributo coloração clara, e indicou diferença significativa entre os três Tratamentos realizados, sendo que o Tratamento 1 foi indicado pelos degustadores como o que possuía a coloração mais clara entre os três (Tabela 15, 1º dia). A coloração amarelada referente à gordura proveniente das coxas e sobrecoxas de frango indicou coloração mais intensa para os Tratamentos T2 e T3, os quais apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) em relação a T1, demonstrando que a oliveira intensificou a tonalidade amarela da gordura. De acordo com Taamalli (2012), os carotenoides são os pigmentos responsáveis pela cor amarela que as folhas de oliveira conferem, e sua concentração pode variar de 1 a 20mg/kg, sendo a luteína o principal componente. Cotrim (2011) e Hayes et al.,(2009) atribuem atividade antioxidante à luteína baseada na sua habilidade de ligar-se à moléculas de oxigênio singlete, impedindo assim a iniciação dos processos oxidativos. Em estudo realizado em carne bovina por Cotrim (2011), 200µg/ml de luteína apresentaram redução nos níveis de malonaldeído na ordem de 45% após 24h.

A textura avaliada através dos atributos suculência e rigidez indicou que T3 apresentou maior suculência que os demais Tratamentos, sendo significativamente ($P < 0,05$) mais suculento que T1. Para o atributo rigidez, a avaliação sensorial indicou valores numericamente maiores para T1, e significativamente ($P < 0,05$) diferentes de T2 (Tabela 15, 1º dia).

Para os atributos odor de ranço e sabor de ranço, a ADQ indicou menores notas para T2 e T3 demonstrando pouca percepção destes atributos pelos degustadores e com isso indicando que a oliveira possui capacidade de retardar o desenvolvimento de sabores e odores de ranço.

Para o atributo sabor de frango fresco, T1 recebeu as menores notas (Tabela 15, 1º dia), sendo significativamente ($P < 0,05$) diferente de T2 e T3, o que é indicativo de que T1 perdeu o frescor inicial da carne. Para o atributo odor de frango, T1 teve nota maior comparada a T2 e T3, demonstrando que a adição de oliveira na ração da dieta dos frangos

proporcionou um maior tempo de frescor, sem aumentar o odor da carne de frango, o qual está associado à alteração organoléptica de produto.

Aos 12 dias foi realizada nova avaliação sensorial para descrever o perfil sensorial dos Tratamentos, resultando na Figura 12. Para os atributos sabor de azeite de oliva e odor de azeite de oliva, as notas foram significativamente ($P < 0,05$) maiores para T2 e T3 em relação a T1 e comparadas com a avaliação sensorial realizada no 1º dia, as notas foram menores, demonstrando que os componentes responsáveis por estes atributos, foram degradados durante a vida de prateleira das coxas e sobrecoxas.

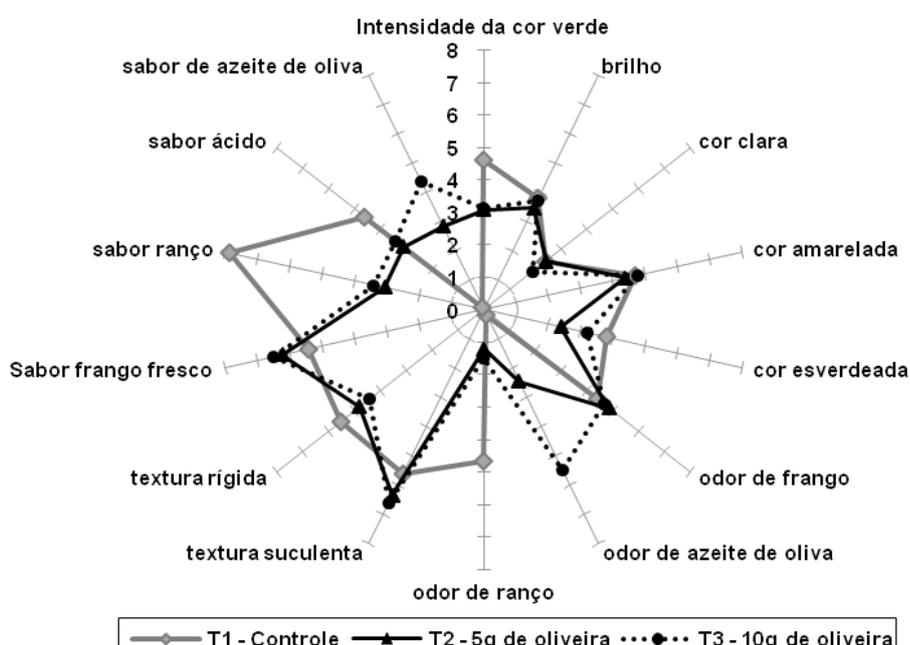


Figura 12 - Valores médios da análise de ADQ das coxas e sobrecoxas dos Tratamentos T1(Controle), T2 (5g de oliveira) e T3 (10g de oliveira), no 12º dia de armazenamento a 4°C (± 1).

Para os atributos intensidade da cor verde e cor esverdeada, avaliados aos 12 dias de acompanhamento com intuito de verificar a oxidação da cor das coxas e sobrecoxas de frango, verificou-se valores significativamente ($P < 0,05$) maiores para T1 em relação a T2 e T3. Este resultado indica que a oliveira interfere positivamente na coloração das coxas e sobrecoxas de frango, onde no 1º dia (Tabela 15, 1º dia), a coloração verde era indicativa da presença de oliveira, (devido a clorofila), T2 e T3 tiveram altos valores, e aos 12 dias (Tabela 15, 12 dias),

onde os atributos de intensidade da cor verde e cor esverdeada são indicativos de oxidação de cor, os valores de T2 e T3 reduziram enquanto os valores de T1 aumentaram significativamente ($P < 0,05$). De acordo com Olivo (2006), o pigmento heme em sua forma sulfomioglobina (globina desnaturada), ocorre quando ácido sulfídrico (H_2S) produzido por bactérias associa-se ao oxigênio e reage com o ferro, mantendo-o reduzido (Fe^{2+}). Isso ocasiona desnaturação da proteína globulina, gerando a cor verde.

A textura avaliada aos 12 dias pelos atributos suculência e rigidez, indicou maciez e suculência significativamente melhores para T2 e T3 em relação a T1, demonstrando que os frangos que receberam ração com folhas de oliveiras tiveram coxas e sobrecoxas mais macias e suculentas.

O sabor de ranço das coxas e sobrecoxas, aumentou significativamente ($P < 0,05$) para T1 em relação a T2 e T3 aos 12 dias, indicando que as folhas de oliveira tiveram capacidade de retardar a formação deste atributo, conforme verificado pelas análises oxidativas.

5.5.2 Intensão de compra das coxas e sobrecoxas armazenadas resfriadas

A Figura 11 apresenta os resultados de intensão de compra das coxas e sobrecoxas de frango dos três tratamentos. A pesquisa revelou elevado grau de aceitação das coxas e sobrecoxas dos frangos que tiveram dietas com oliveiras veiculadas a ração. Esta aceitação foi avaliada pelas marcações “Certamente compraria” e “Provavelmente compraria”, resultando em 80 % de aceite para T3 e 70% de aceite para T2, as quais foram superiores ao T1 que teve apenas 20% de aceite. Os consumidores que escolheram as coxas e sobrecoxas tratadas com folhas de oliveira como opção para compra, indicaram que o atributo responsável pela escolha foi o sabor.

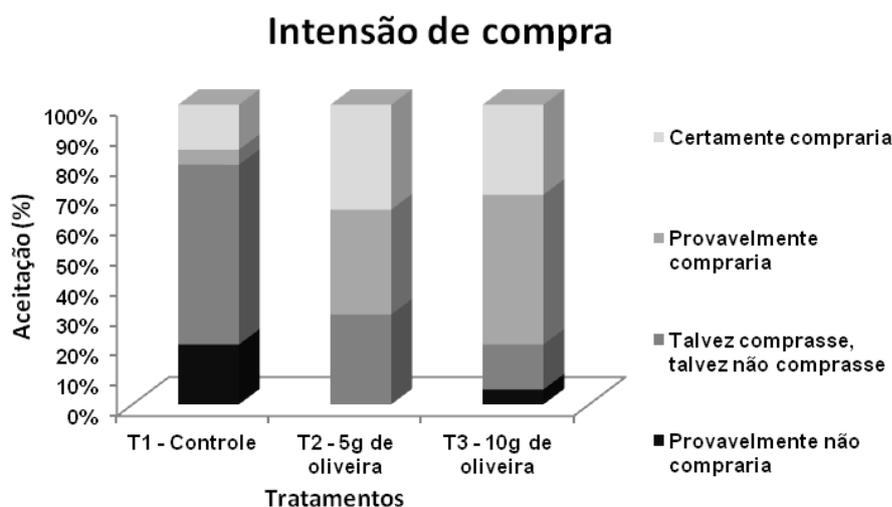


Figura 13 - Resultado do teste de Intensão de compra das coxas e sobrecoxas de frango.

5.6. AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS COXAS E SOBRECOXAS ARMAZENADAS CONGELADAS

As coxas e sobrecoxas armazenadas congeladas foram submetidas a descongelamento em refrigerador por 12 horas em temperatura de 4 a 8°C. Após descongelamento, a carne foi separada da pele e do osso para análise físico-química.

A Tabela 16 apresenta os resultados de lipídios, proteína, umidade, resíduo mineral fixo, pH e a_w das coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a -18°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 4 meses.

Aos 30 dias os valores de proteína (tabela 16) foram 18,030, 18,246 e 18,060 para T1, T2 e T3, respectivamente. No período de análise de 4 meses não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Os resultados oscilaram entre 17,95 e 18,24% e ficaram próximos aos das coxas e sobrecoxas avaliadas resfriadas (tabela 8), entre 17,9 e 18,1% e ambos estão semelhantes aos apresentados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (1998), que indica valores de 17,6% e 17,8% de proteína para carne de sobrecoxa e coxa de frango, respectivamente.

A determinação de lipídeos nas amostras de coxas e sobrecoxas (Tabela 16) indicou valores iniciais de 7,043; 7,103 e 7,026 % para T1, T2 e T3, respectivamente. Durante os 4 meses de acompanhamento não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 16 - Valores de lipídeos, proteína, umidade, resíduo mineral fixo, pH e a_w em coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a -18°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 120 dias.

Parâmetros		Período de análise				
		1	30	60	90	120
Lipídios (g kg^{-1})	T1	6,836 ^b	7,043 ^a	7,010 ^a	7,040 ^a	7,060 ^a
		($\pm 0,179$)	($\pm 0,040$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,026$)
	T2	9,284 ^a	7,103 ^a	7,100 ^a	7,050 ^a	7,013 ^a
		($\pm 0,515$)	($\pm 0,021$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,030$)	($\pm 0,015$)
	T3	5,807 ^b	7,026 ^a	7,083 ^a	7,076 ^a	7,060 ^a
		($\pm 0,259$)	($\pm 0,025$)	($\pm 0,021$)	($\pm 0,025$)	($\pm 0,026$)
Proteína (g kg^{-1})	T1	18,070 ^a	18,030 ^a	18,023 ^a	17,950 ^a	17,986 ^a
		($\pm 0,010$)	($\pm 0,030$)	($\pm 0,015$)	($\pm 0,050$)	($\pm 0,078$)
	T2	18,050 ^a	18,246 ^a	18,076 ^a	18,000 ^a	18,043 ^a
		($\pm 0,010$)	($\pm 0,307$)	($\pm 0,025$)	($\pm 0,050$)	($\pm 0,021$)
	T3	18,011 ^a	18,060 ^a	18,046 ^a	17,980 ^a	18,043 ^a
		($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,035$)	($\pm 0,101$)	($\pm 0,051$)
umidade (%)	T1	69,473 ^a	69,960 ^a	68,960 ^a	67,600 ^a	66,900 ^a
		($\pm 0,890$)	($\pm 0,046$)	($\pm 0,151$)	($\pm 0,265$)	($\pm 0,200$)
	T2	67,750 ^a	67,767 ^c	67,700 ^b	66,267 ^b	65,233 ^b
		($\pm 0,630$)	($\pm 0,252$)	($\pm 0,265$)	($\pm 0,208$)	($\pm 0,451$)
	T3	68,267 ^a	68,700 ^b	68,100 ^b	66,617 ^b	65,266 ^b
		($\pm 0,900$)	($\pm 0,361$)	($\pm 0,100$)	($\pm 0,144$)	($\pm 0,153$)
Resíduo mineral fixo (%)	T1	0,917 ^a	0,910 ^a	0,910 ^a	0,913 ^a	0,913 ^a
		($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,006$)	($\pm 0,006$)
	T2	0,920 ^a	0,915 ^a	0,917 ^a	0,915 ^a	0,918 ^a
		($\pm 0,025$)	($\pm 0,003$)	($\pm 0,006$)	($\pm 0,005$)	($\pm 0,008$)
	T3	0,927 ^a	0,915 ^a	0,913 ^a	0,913 ^a	0,910 ^a
		($\pm 0,125$)	($\pm 0,005$)	($\pm 0,003$)	($\pm 0,015$)	($\pm 0,017$)
pH	T1	5,897 ^a	5,917 ^a	5,987 ^a	6,060 ^a	6,060 ^a
		($\pm 0,015$)	($\pm 0,015$)	($\pm 0,032$)	($\pm 0,036$)	($\pm 0,020$)
	T2	5,840 ^a	5,890 ^a	5,910 ^b	5,943 ^b	5,933 ^b
		($\pm 0,010$)	($\pm 0,020$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,006$)	($\pm 0,006$)
	T3	5,820 ^b	5,807 ^b	5,917 ^b	5,930 ^b	5,953 ^b
		($\pm 0,017$)	($\pm 0,012$)	($\pm 0,015$)	($\pm 0,026$)	($\pm 0,006$)
a_w	T1	0,995 ^a	0,995 ^a	0,994 ^a	0,993 ^a	0,993 ^a
		($\pm 0,000$)	($\pm 0,001$)			
	T2	0,994 ^b	0,993 ^b	0,992 ^b	0,991 ^b	0,991 ^b
		($\pm 0,000$)				
	T3	0,994 ^b	0,994 ^b	0,993 ^b	0,992 ^b	0,992 ^b
		($\pm 0,000$)				

Nota 1: a,b,c são analisadas entre T1, T2 e T3 por intervalo de análise. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

Neste estudo os valores de pH das coxas e sobrecoxas congeladas iniciaram com valores de 5,897, 5,840 e 5,820 para T1, T2 e T3, respectivamente, (Tabela 16), e a partir dos 60 dias de acompanhamento, os tratamentos foram influenciados pela presença de folhas de oliveira, onde T2 e T3 apresentaram valores significativamente ($P < 0,05$) menores que T1. O pH elevado de T1 dos 60 aos 120 dias (5,987, 6,060 e 6,060), conforme relatado por Porto (2006) está relacionado a processos do metabolismo de bactérias sendo mais propício ao desenvolvimento bacteriano. Beraquet (2000) verificou que carne de sobrecoxa desossada manualmente apresentou um pH de aproximadamente 5,8 a 6,2. Racanicci (2004) obteve um pH de 6,17 para sobrecoxa de frangos alimentados com dietas adicionadas de óleo de vísceras de frango fresco e oxidado.

Os valores de resíduo mineral fixo para as coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a -18°C (± 1) não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos no período avaliado (Tabela 16), indicando que a oliveira não teve influência sobre este parâmetro. Estes percentuais ficaram próximos aos verificados no armazenamento resfriado (4°C) (Tabela 8), indicando que a temperatura não teve influência sobre o resíduo mineral fixo.

O percentual de umidade encontrado nas coxas e sobrecoxas inicial foi de 69,473, 67,750 e 68,267 e aos 120 dias de 66,9, 65,23 e 65,26 para T1, T2 e T3, respectivamente (Tabela 116). Os valores foram reduzindo para os três tratamentos no decorrer do armazenamento a -18°C (± 1), onde dos 60 aos 120 dias, verificou-se percentuais significativamente ($P < 0,05$) menores para os tratamentos que receberam adição de folhas de oliveira em relação ao Tratamento controle. Considerando que todas as amostras foram armazenadas sob a mesma condição de embalagem e de temperatura, pode-se dizer que a carne de T1 torna este tratamento propício ao desenvolvimento microbiano, uma vez que Pardi et al., (2005) indica valores de 65 a 74 como favoráveis ao desenvolvimento microbiano. Ao avaliar a estabilidade oxidativa de carne de frango, Pino (2005) encontrou valores de umidade maiores que os encontrados neste estudo, variando entre 68,07 e 70,17%.

Os valores de a_w durante os 120 dias de acompanhamento variaram entre 0,993 e 0,995 para os três tratamentos (Tabela 16) e apresentaram diferença significativa entre si, sendo verificados menores valores para os tratamentos que receberam adição de folhas de oliveira (T2 e T3) comparados a T1, o que é indicativo de que as folhas de oliveira têm influência positiva sobre o parâmetro de a_w , pois segundo Welti e Verdgara (1997), uma menor quantidade de água livre para reações físicas, químicas e biológicas torna o alimento menos

susceptível a deterioração. Após o congelamento das amostras, observou-se redução nos valores de a_w em relação ao primeiro dia de análise, demonstrando que a redução da temperatura exerce efeito positivo sobre este parâmetro.

O perfil de ácidos graxos livres apresentado na Tabela 17 indicou não haver diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos. Durante o armazenamento a -18°C , os ácidos graxos encontrados nas coxas e sobrecoxas de frango praticamente não sofreram variação em seus percentuais quando comparados ao primeiro dia de análise, demonstrando que o abaixamento da temperatura não exerce efeito significativo sobre este parâmetro.

Tabela 17 - Perfil de ácidos graxos livres nas coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a -18°C (±1°C) por 120 dias.

Parâmetros		Período de análise			
		30	60	90	120
Saturados Σ (SFA)	T1	32,72	32,08	30,36	32,32
	T2	31,56	31,29	31,45	32,44
	T3	31,21	31,65	31,44	31,33
Monoinsaturados Σ (MUFA)	T1	43,11	43,24	41,74	45,05
	T2	46,49	43,56	41,48	43,95
	T3	45,32	44,94	42,62	46,55
Poli-insaturados Σ (PUFA)	T1	21,11	22,10	23,34	21,79
	T2	19,32	21,68	18,30	19,75
	T3	20,55	20,00	20,29	19,94
C 14:0	T1	0,87 ^a (±0,75)	0,45 ^a (±0,75)	0,41 ^a (±0,04)	0,49 ^a (±0,02)
	T2	0,61 ^a (±0,29)	0,41 ^a (±0,03)	0,41 ^a (±0,02)	0,45 ^a (±0,00)
	T3	0,46 ^a (±0,01)	0,48 ^a (±0,01)	0,45 ^a (±0,00)	0,48 ^a (±0,02)
C 15:0	T1	0,11 ^a (±0,09)	0,58 ^a (±0,17)	0,54 ^a (±0,08)	0,06 ^a (±0,00)
	T2	0,11 ^a (±0,06)	0,65 ^a (±0,09)	0,32 ^a (±0,40)	0,07 ^a (±0,01)
	T3	0,10 ^a (±0,00)	0,67 ^a (±0,07)	0,26 ^a (±0,34)	0,06 ^a (±0,00)
C 16:0	T1	23,13 ^a (±1,47)	22,67 ^a (±1,20)	21,34 ^a (±0,98)	23,83 ^a (±0,63)
	T2	23,04 ^a (±1,31)	21,94 ^a (±0,61)	22,65 ^a (±0,10)	24,06 ^a (±0,52)
	T3	22,93 ^a (±2,03)	22,06 ^a (±0,87)	22,49 ^a (±0,45)	23,92 ^a (±0,69)
C 18:0	T1	8,29 ^a (±2,88)	7,84 ^a (±0,24)	7,53 ^a (±0,34)	7,44 ^a (±0,37)
	T2	7,47 ^a (±1,57)	7,80 ^a (±0,15)	7,53 ^a (±0,13)	7,43 ^a (±0,74)
	T3	7,31 ^a (±0,74)	7,92 ^a (±0,19)	7,71 ^a (±0,49)	6,48 ^a (±0,21)
C 20:0	T1	0,16 ^a (±0,04)	0,16 ^a (±0,04)	0,17 ^a (±0,09)	0,21 ^a (±0,04)
	T2	0,17 ^a (±0,05)	0,19 ^a (±0,07)	0,17 ^a (±0,01)	0,16 ^a (±0,02)
	T3	0,20 ^a (±0,03)	0,23 ^a (±0,05)	0,18 ^a (±0,02)	0,19 ^a (±0,03)
C 22:0	T1	0,13 ^a (±0,02)	0,35 ^a (±0,00)	0,35 ^a (±0,01)	0,28 ^a (±0,01)
	T2	0,12 ^a (±0,03)	0,27 ^a (±0,07)	0,35 ^a (±0,00)	0,26 ^a (±0,04)
	T3	0,19 ^a (±0,05)	0,27 ^a (±0,09)	0,34 ^a (±0,02)	0,17 ^a (±0,06)
C 16:1	T1	4,04 ^a (±1,02)	4,44 ^a (±0,25)	4,10 ^a (±0,59)	4,70 ^a (±0,22)
	T2	4,53 ^a (±0,41)	2,89 ^a (±0,16)	1,70 ^a (±0,00)	3,24 ^a (±0,70)
	T3	4,22 ^a (±0,78)	4,56 ^a (±0,30)	4,87 ^a (±0,35)	5,37 ^a (±0,79)
C 18:1 n9	T1	38,22 ^a (±2,12)	36,98 ^a (±1,73)	37,32 ^a (±1,26)	38,15 ^a (±1,37)
	T2	41,11 ^a (±1,40)	37,81 ^a (±0,66)	38,92 ^a (±1,31)	38,59 ^a (±2,39)
	T3	40,23 ^a (±1,99)	37,20 ^a (±0,13)	37,12 ^a (±0,57)	39,71 ^a (±0,16)
C 20:1	T1	0,31 ^a (±0,13)	0,24 ^a (±0,09)	0,31 ^a (±0,03)	0,30 ^a (±0,03)
	T2	0,32 ^a (±0,04)	1,07 ^b (±0,10)	0,30 ^a (±0,02)	0,28 ^a (±0,04)
	T3	0,28 ^a (±0,01)	1,17 ^b (±0,19)	0,31 ^a (±0,04)	0,25 ^a (±0,06)
C 18:2 n6	T1	19,53 ^a (±5,34)	20,64 ^a (±2,32)	21,78 ^a (±1,23)	20,38 ^a (±0,27)
	T2	17,96 ^a (±1,75)	20,40 ^a (±0,04)	18,13 ^b (±1,73)	18,50 ^a (±1,81)
	T3	19,49 ^a (±3,41)	19,69 ^a (±0,60)	19,20 ^{ab} (±0,84)	18,62 ^a (±1,65)
C 20:2	T1	0,17 ^a (±0,08)	0,22 ^a (±0,05)	0,19 ^a (±0,04)	0,14 ^a (±0,02)
	T2	0,09 ^a (±0,00)	0,29 ^a (±0,03)	0,17 ^a (±0,02)	0,14 ^a (±0,00)
	T3	0,08 ^a (±0,00)	0,30 ^a (±0,04)	0,15 ^a (±0,01)	0,10 ^a (±0,02)

Nota 1: a,b,c são analisadas na horizontal, entre os três tratamentos no mesmo intervalo de análise. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

Tabela 18 - Valores de TBARs, índice de peróxidos, dienos conjugados, e Proteínas carboniladas em coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a -18°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 120 dias.

Parâmetros		Período de análise				
		1	30	60	90	120
TBARs (MDA equivalents, $\mu\text{g/Kg}$)	T1	0,059 ^a ($\pm 0,009$)	0,150 ^a ($\pm 0,065$)	0,075 ^a ($\pm 0,032$)	0,082 ^a ($\pm 0,024$)	0,177 ^a ($\pm 0,012$)
	T2	0,045 ^a ($\pm 0,011$)	0,030 ^b ($\pm 0,018$)	0,059 ^a ($\pm 0,034$)	0,079 ^a ($\pm 0,008$)	0,155 ^{a,b} ($\pm 0,015$)
	T3	0,089 ^a ($\pm 0,054$)	0,087 ^b ($\pm 0,081$)	0,065 ^a ($\pm 0,025$)	0,085 ^a ($\pm 0,018$)	0,125 ^b ($\pm 0,023$)
	T1	0,179 ^a ($\pm 0,000$)	0,000994 ^a ($\pm 0,002$)	0,001391 ^a ($\pm 0,002$)	0,000259 ^a ($\pm 0,000$)	0,001640 ^a ($\pm 0,003$)
	T2	0,147 ^a ($\pm 0,000$)	0,000003 ^b ($\pm 0,000$)	0,000009 ^b ($\pm 0,000$)	0,000001 ^b ($\pm 0,000$)	0,000013 ^b ($\pm 0,000$)
	T3	0,349 ^a ($\pm 0,000$)	0,000010 ^b ($\pm 0,000$)	0,000008 ^b ($\pm 0,000$)	0,000001 ^b ($\pm 0,000$)	0,000011 ^b ($\pm 0,000$)
Dienos conjugados (abs./mg lip./ml ciclohex)	T1	0,259 ^a ($\pm 0,020$)	0,205 ^a ($\pm 0,126$)	0,194 ^a ($\pm 0,021$)	0,241 ^a ($\pm 0,065$)	0,154 ^a ($\pm 0,010$)
	T2	0,251 ^a ($\pm 0,018$)	0,228 ^a ($\pm 0,022$)	0,218 ^a ($\pm 0,031$)	0,254 ^a ($\pm 0,073$)	0,174 ^a ($\pm 0,008$)
	T3	0,311 ^a ($\pm 0,063$)	0,245 ^a ($\pm 0,042$)	0,198 ^a ($\pm 0,009$)	0,280 ^a ($\pm 0,027$)	0,160 ^a ($\pm 0,019$)
	T1	1,235 ^a ($\pm 0,414$)	0,099 ^a ($\pm 0,015$)	0,178 ^a ($\pm 0,067$)	0,115 ^a ($\pm 0,018$)	0,070 ^a ($\pm 0,005$)
	T2	1,015 ^a ($\pm 0,361$)	0,082 ^a ($\pm 0,020$)	0,159 ^a ($\pm 0,021$)	0,091 ^a ($\pm 0,012$)	0,089 ^a ($\pm 0,011$)
	T3	0,973 ^a ($\pm 0,246$)	0,064 ^a ($\pm 0,003$)	0,183 ^b ($\pm 0,002$)	0,077 ^b ($\pm 0,002$)	0,050 ^b ($\pm 0,006$)

Nota 1: a,b,c são analisadas entre T1, T2 e T3 por intervalo de análise. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

A análise de dienos conjugados realizada durante armazenamento a -18°C (± 1) não demonstrou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos, indicando que a oliveira não apresentou influência sobre este parâmetro na condição congelada. Em relação ao

primeiro dia de análise, o congelamento proporcionou redução da quantidade de dienos conjugados dos três tratamentos, dos 30 aos 120 dias. Paiva-Martins et al. (2009) ao avaliarem o teor de dienos conjugados em suínos suplementados com 5% e 10% de folhas de oliveiras na dieta, observaram aos 8 dias de armazenamento a 4°C, que as folhas de oliveiras tiveram influência sobre a formação de dienos conjugados, pois os suínos que não receberam folhas de oliveiras (controle) apresentaram valores seis vezes superior aos demais tratamentos.

O congelamento das coxas e sobrecoxas de frango proporcionou redução significativa do índice de peróxidos dos três tratamentos comparando o primeiro dia de análise aos demais dias de acompanhamento (Tabela 18), demonstrando que o abaixamento da temperatura tem efeito positivo sobre os peróxidos. Os valores de índice de peróxidos encontrados nas coxas e sobrecoxas de frango apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos dos 30 ($9,9 \times 10^{-2}$; 3×10^{-4} ; 1×10^{-3}) aos 120 ($1,6 \times 10^{-3}$; $1,3 \times 10^{-5}$; $1,1 \times 10^{-5}$) dias de acompanhamento. Os tratamentos que receberam adição de folhas de oliveira via dieta apresentaram valores de peróxidos significativamente ($P < 0,05$) menores que T1, indicando que a adição de folhas de oliveira via ração de dieta de frangos tem capacidade de retardar o início do processo oxidativo. Valores de peróxidos acima de 5 mEq/kg gordura, indicam características sensoriais indesejáveis e já perceptíveis ao paladar, e valores acima de 10 mEq tornam o produto inadequado para o consumo, caracterizando um avançado processo de rancificação (FERRARI & KOLLER, 2001; FEDDERN et al., 2010). Portanto, os valores de peróxidos apresentados no presente estudo foram menores quando comparados aos citados por Ferrari & Koller (2001) e Feddern et al. (2010), o que torna possível observar que a oxidação lipídica ocorrida nas coxas e sobrecoxas de frango não provocou danos à qualidade do produto (Tabela 18).

Os valores médios de TBARs das coxas e sobrecoxas de frango foram de 0,059; 0,045 e 0,089 no início do experimento e de 0,177; 0,155 e 0,125 mg MDA/kg de amostra ao final dos 120 dias para T1, T2 e T3, respectivamente. O número de TBARs para as coxas e sobrecoxas de frango indicou menores valores para os tratamentos que receberam adição de folhas de oliveira via dieta (Tabela 18) durante o armazenamento a -18°C, demonstrando uma tendência de redução oxidativa nas coxas e sobrecoxas dos frangos que receberam folhas de oliveira via dieta. O número de TBARs dos três tratamentos sofreu um ligeiro aumento após o congelamento, o que segundo Pino (2005), pode ter ocorrido devido a uma possível desidratação provocada pela baixa temperatura, que resulta em uma menor a_w , favorecendo a

deterioração lipídica. Racanicci (2004), que também trabalhou com sobrecoxas de frango, verificou o mesmo comportamento de aumento dos valores de TBARs no período inicial do armazenamento congelado, onde seus valores variaram de 0,160 iniciais a 0,474 mg de malonaldeído/kg no quinto mês de análise. Verma & Sahoo (2000), indicaram concentrações entre 1-2 mg MDA/kg como valores limites para a detecção de ranço. Chouliara et al. (2008) determinaram valores de 3 MDA/kg de carne que estariam associados com a rancidez oxidativa. Considerando estes valores, as coxas e sobrecoxas de frango estavam em ótimas condições, uma vez que apresentaram valores de MDA bem abaixo dos mencionados por Verna & Sahoo (2000) e Chouliara et al. (2008).

A oxidação proteica das coxas e sobrecoxas de frango no presente estudo resultou em valores de 1,235; 1,015 e 0,973 η mol carbonil/mg proteína no 1º dia de análise e após congelamento teve redução dos valores para 0,099; 0,082 e 0,064 η mol/mg em T1, T2 e T3, respectivamente aos 30 dias de estocagem a -18°C . Aos 60 dias, todos os tratamentos apresentaram aumento nos valores de proteínas carboniladas, e aos 90 e 120 dias de armazenamento reduziram seus valores (Tabela 18). O aumento nos valores de proteínas carboniladas aos 60 dias de armazenamento pode ser devido aos produtos primários da oxidação lipídica (dienos conjugados) terem reagido com as proteínas provocando assim aumento da oxidação proteica (KIKUGAWA, KATO & HAYASAKA, 1991). A redução dos valores aos 90 e 120 dias de armazenamento pode estar relacionado á relação de que conforme aumenta a quantidade de produtos secundários da oxidação lipídica (TBARs), a formação de compostos carbonílicos oriundos da oxidação proteica ainda está crescendo, e atingirão um nível maior algum tempo depois (ESTÉVEZ et al., 2008; LUND et al., 2011). Observando os dados da Tabela 18, percebeu-se que aos 90 e 120 dias ocorreu aumento nos valores de TBARs e redução de proteínas carboniladas. Portanto, parece haver uma relação nos produtos secundários da oxidação e formação de compostos carbonílicos. Soyer et al. (2010) ao analisarem carnes de peito de frangos suplementados com dieta padrão durante 6 meses a -18°C , encontraram aos 120 dias de armazenamento 1,5 η mol carbonil/mg proteína, com aumento no valor de proteínas carboniladas ao longo do tempo, atingindo valor máximo de 1,9 η mol carbonil/mg proteína aos 180 dias de armazenamento, indicando que o tempo de armazenamento sob congelamento tem grande impacto sobre a oxidação proteica da carne. Analisando as proteínas carboniladas entre os tratamentos, percebeu-se que o tratamento que recebeu adição de 10g de oliveira/kg de ração apresentou valores significativamente ($P<0,05$) menores de proteínas carboniladas que os tratamentos T1 e T2, aos 90 e 120 dias de

acompanhamento, indicando que as folhas de oliveira usadas na suplementação de frango nesta quantidade, tem efeito positivo sobre a carne.

O resultado de exsudação e de CRA das coxas e sobrecoxas armazenadas a -18°C por 120 dias é apresentado na Tabela 19.

Tabela 19 - Valores de exsudação e de CRA em coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a -18°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 120 dias.

Parâmetros		Período de análise				
		1	30	60	90	120
Exsudação (%)	T1	1,087 ^a	1,087 ^a	1,115 ^a	1,258 ^a	1,430 ^a
		($\pm 0,076$)	($\pm 0,015$)	($\pm 0,015$)	($\pm 0,012$)	($\pm 0,010$)
	T2	1,10 ^a	0,960 ^b	0,981 ^b	1,077 ^b	1,070 ^b
		($\pm 0,036$)	($\pm 0,021$)	($\pm 0,021$)	($\pm 0,012$)	($\pm 0,010$)
	T3	0,830 ^b	0,783 ^c	0,813 ^c	0,826 ^c	0,840 ^c
		($\pm 0,055$)	($\pm 0,006$)	($\pm 0,006$)	($\pm 0,015$)	($\pm 0,032$)
CRA (%)	T1	19,200 ^b	18,903 ^c	19,467 ^c	19,857 ^b	19,910 ^b
		($\pm 0,001$)	($\pm 0,002$)	($\pm 0,005$)	($\pm 0,008$)	($\pm 0,019$)
	T2	19,670 ^b	19,443 ^b	19,723 ^b	19,973 ^b	20,010 ^b
		($\pm 0,001$)	($\pm 0,002$)	($\pm 0,004$)	($\pm 0,025$)	($\pm 0,016$)
	T3	20,310 ^a	19,917 ^a	20,233 ^a	20,543 ^a	20,657 ^a
		($\pm 0,001$)	($\pm 0,002$)	($\pm 0,003$)	($\pm 0,014$)	($\pm 0,002$)

Nota 1: a,b,c são analisadas entre T1, T2 e T3 por intervalo de análise. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

A CRA avaliada nas coxas e sobrecoxas de frango iniciou com valores de 19,200; 19,670 e 20,310 e aos 120 dias resultou em valores de 19,910; 20,010 e 20,657 para T1, T2 e T3, respectivamente. Estes resultados indicam valores de CRA significativamente ($P < 0,05$) maiores para os tratamentos que receberam adição de folhas de oliveira via dieta em relação ao tratamento que recebeu dieta convencional durante os 120 dias. De acordo com Huallanco (2004) uma alta CRA equivale a maior suculência, maior palatabilidade e percepção sensorial com conseqüente melhoria da qualidade da carne, indicando o efeito positivo das folhas de oliveira sobre este parâmetro. Segundo Roça (1999) a CRA do tecido muscular tem grande importância durante o armazenamento da carne, e quando os tecidos tem baixa CRA, ocorrem perdas de umidade e conseqüente aumento de exsudação durante armazenamento. Esta relação foi verificada no presente estudo (Tabela 19) do 1º aos 120 dias de acompanhamento

constatando que menores valores de CRA são mais propícios a perdas de exsudato. A exsudação das coxas e sobrecoxas de frango durante os 120 dias de armazenamento a -18°C , apresentada na Tabela 19, demonstrou que do 1° ao 30° dia de avaliação, houve redução de exsudação para T2 e T3, e dos 30 aos 120 dias, houve aumento da perda de exsudato para os três tratamentos. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) dos 30 (1,087; 0,960; 0,783) aos 120 (1,430; 1,070; 0,840) dias para T1, T2 e T3, respectivamente, onde T2 e T3 apresentaram menor exsudação que T1. Os resultados de menores perdas por exsudação dos tratamentos que receberam folhas de oliveira na dieta é positivo para a carne de frango, pois segundo JENSEN et al., (1998), a perda de exsudato é um dos principais fatores na diminuição da qualidade de produtos cárneos.

Os tratamentos que receberam adição de folhas de oliveira apresentaram maiores valores de CRA em relação a T1 e conseqüentemente tiveram menores valores de exsudação (Tabela 19). Os tratamentos com menor exsudação (T2 e T3) também registraram valores significativamente ($P < 0,05$) menores de pH em relação a T1 do 1° (5,897; 5,840; 5,820) aos 120 (6,060; 5,933; 5,953) dias de armazenamento, para T1, T2 e T3, respectivamente. Vieira (2007), ao avaliar filés de peito de frango, verificou aumento da perda de exsudato com a diminuição do pH, valores divergentes dos encontrados neste estudo. Olivo (2006) preconiza que a diminuição de pH causa desnaturação das proteínas que ligam a água na carne, promovendo acúmulo de umidade fora das células, no espaço intersticial. A desnaturação proteica causada pelo abaixamento do pH não ocorreu neste estudo, indicando que as folhas de oliveira melhoraram a CRA das coxas e sobrecoxas de frango mesmo com pH significativamente menores que T1. O pH das coxas e sobrecoxas de T2 e T3 ficou acima do pI (pH 5,2 a 5,3) o que de acordo com Roça (1999), ao avaliar o efeito do pH na quantidade de água imobilizada da carne devido a sua influência na distribuição dos grupos carregados da superfície, ocasiona desaparecimento das cargas positivas, resultando em um excesso de cargas negativas que determinam a repulsão dos filamentos da carne, deixando mais espaço para as moléculas de água, e conseqüentemente melhorando sua CRA.

A determinação objetiva da cor apresentada na Tabela 20 expressa os valores de L^* , a^* e b^* para as coxas e sobrecoxas de frango, e a Figura 14 ilustra esta análise.

Tabela 20 - Valores médios de Cor (L*, a*, b*) das coxas e sobrecoxas dos frangos armazenados a -18°C (±1°C) por 120 dias.

Parâmetro/Periodicidade		T1	T2	T3
L* coxas	1	57,580 ^a (±2,000)	56,150 ^a (±1,480)	56,690 ^a (±2,440)
	30	76,537 ^b (±0,862)	82,863 ^a (±0,356)	80,483 ^a (±1,850)
	60	59,203 ^{ab} (±3,806)	61,027 ^a (±0,178)	54,910 ^b (±1,464)
	90	63,250 ^a (±1,403)	54,813 ^c (±1,155)	58,820 ^b (±0,375)
	120	55,557 ^a (±2,187)	58,707 ^a (±1,525)	56,650 ^a (±1,535)
a* coxas	1	17,310 ^a (±1,700)	13,450 ^a (±1,360)	14,370 ^a (±2,120)
	30	7,2170 ^a (±1,089)	4,163 ^b (±0,901)	7,440 ^a (±0,246)
	60	16,413 ^a (±3,446)	14,240 ^a (±0,587)	18,843 ^a (±0,833)
	90	12,693 ^b (±0,741)	18,700 ^a (±0,652)	14,137 ^b (±1,664)
	120	17,040 ^a (±0,851)	16,653 ^a (±0,868)	17,133 ^a (±0,484)
b* coxas	1	8,570 ^b (±1,430)	15,660 ^a (±3,280)	14,240 ^a (±1,360)
	30	2,047 ^a (±0,942)	3,820 ^a (±2,495)	3,140 ^a (±1,801)
	60	15,680 ^a (±2,852)	12,680 ^a (±1,533)	14,840 ^a (±1,839)
	90	13,133 ^a (±2,230)	11,827 ^a (±0,849)	10,950 ^a (±3,728)
	120	8,093 ^b (±1,836)	13,717 ^a (±1,587)	14,003 ^a (±2,866)
L* sobrecoxas	1	54,560 ^a (±0,970)	52,780 ^a (±1,730)	54,400 ^a (±2,930)
	30	74,800 ^a (±2,049)	77,950 ^a (±0,606)	76,367 ^a (±0,882)
	60	54,083 ^b (±1,138)	59,010 ^a (±0,864)	55,090 ^b (±1,872)
	90	59,267 ^a (±1,079)	51,903 ^b (±2,045)	56,467 ^a (±0,800)
	120	52,350 ^b (±1,516)	58,793 ^a (±2,134)	57,267 ^a (±1,041)
a* sobrecoxas	1	13,950 ^a (±1,150)	16,760 ^a (±0,650)	15,900 ^a (±2,360)
	30	11,290 ^a (±2,194)	5,520 ^b (±0,306)	7,197 ^b (±0,943)
	60	16,433 ^a (±1,528)	14,780 ^a (±0,391)	17,417 ^a (±2,471)
	90	15,330 ^c (±0,182)	20,687 ^a (±0,573)	17,583 ^b (±0,993)
	120	20,010 ^a (±0,750)	19,233 ^a (±1,620)	15,117 ^b (±1,388)
b* sobrecoxas	1	10,420 ^a (±2,070)	11,770 ^a (±1,750)	12,200 ^a (±0,460)
	30	1,347 ^b (±0,621)	8,227 ^a (±3,127)	2,723 ^{ab} (±2,748)
	60	12,243 ^a (±4,752)	14,067 ^a (±3,605)	11,617 ^a (±3,629)
	90	16,127 ^a (±2,552)	10,957 ^a (±2,223)	12,660 ^a (±3,168)
	120	9,533 ^b (±1,693)	17,763 ^a (±1,193)	9,133 ^b (±1,331)

Nota 1: a,b,c são analisadas na horizontal. Letras diferentes apresentam diferença significativa (P<0,05) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

As coxas e sobrecoxas pertencentes ao tratamento T2 apresentaram maiores valores de luminosidade aos 30, 60 e 120 dias em relação a T1 e T3 (Tabela 20). Amador (2013), ao analisar carne de coxas e sobrecoxas de frangos alimentados com dietas contendo diferentes

antioxidantes naturais, encontrou valor de L^* variando de 46,63 a 48,58 e pH de 5,97 a 6,16. Comparando os resultados do presente estudo com os encontrados por Amador (2013), percebeu-se semelhança nos valores de pH (Tabela 8) e resultados de maior luminosidade para o presente estudo, porém não se pode afirmar que as folhas de oliveiras dadas aos frangos influenciaram os valores de L^* da carne de coxas e sobrecoxas de frangos, uma vez que os tratamentos não diferiram significativamente ($P < 0,05$) entre si (Tabela 20).

Le Bihan-Duval et al. (1999) observaram que os maiores valores de luminosidade estavam associados as maiores perdas de água por exsudação. Isto não ocorreu nas coxas e sobrecoxas congeladas (Tabelas 16 e 17). Porém, quando comparamos os valores de luminosidade e de perda de água por exsudação das coxas e sobrecoxas congeladas com o 1º dia de análise das coxas e sobrecoxas resfriadas L^* (57,58; 56,15; 56,69/54,56; 52,78; 54,40) e exsudação (1,087; 1,103 e 0,830) de T1, T2 e T3, respectivamente, observam-se maiores valores de luminosidade (L^*) e maiores perdas de exsudação, concordando com o que foi observado por Le Bihan-Duval et al. (1999).

Os valores de L^* , a^* , b^* variaram durante os 120 dias de análise, não indicando tendência entre as amostras. Este resultado demonstra que as folhas de oliveira adicionadas via dieta não promoveram alterações de coloração nas coxas e sobrecoxas avaliadas in natura dos frangos de T3 e T2 em relação ao tratamento que recebeu dieta convencional (T1).

A Figura 14 apresenta a coloração das coxas e sobrecoxas de frango com exposição à luz natural, após o descongelamento por 12 h em refrigerador em temperatura de 4 a 8°C.

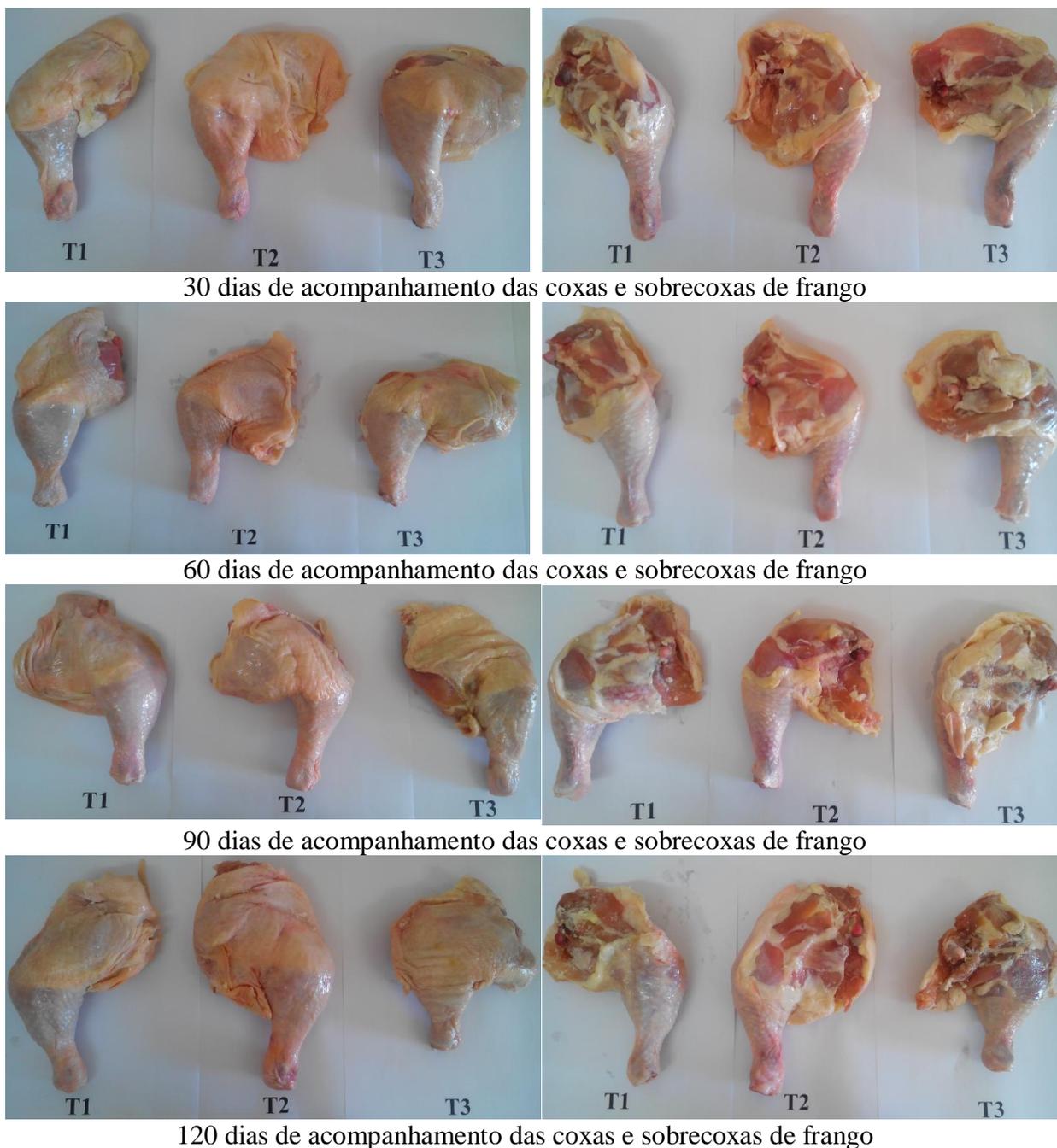


Figura 14 - Fotografia das coxas e sobrecoxas armazenadas congeladas expostas à luz natural, obtida em resolução de 7,2 megapixels e qualidade de impressão 600 dpi.

Nota 1: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

5.7. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS COXAS E SOBRECoxAS ARMAZENADAS CONGELADAS

As coxas e sobrecoxas armazenadas congeladas foram submetidas a descongelamento em refrigerador por 12 horas em temperatura de 4 a 8°C. Após descongelamento, a carne foi separada da pele e do osso para análise microbiológica.

Na conservação da carne de frango, o processo de congelamento é um recurso fundamental para impedir o desenvolvimento de micro-organismos nocivos, adiar reações químicas indesejáveis, conservar a estrutura física inalterada, e garantir a higiene sanitária na manipulação de alimentos. A redução da temperatura prolonga o tempo de armazenamento e a vida útil da carne de frango, retardando a multiplicação microbiana.

Na Figura 15 é apresentado o número de colônias (\log_{10} UFC/g) de bactérias aeróbias mesófilas (BAM), bactérias ácido lácticas (BAL), bactérias aeróbias psicotróficas (BAP) e bactérias *pseudomonas* (BP).

As contagens de bactérias aeróbias mesófilas, ácido lácticas, psicotróficas e *pseudomonas* tiveram pouca oscilação durante os 120 dias. O congelamento teve mais influencia sobre as bactérias aeróbias mesófilas e *pseudomonas* reduzindo o número de colônia destes entre o 1° e 30° dia de análise. Enquanto congelada, a água não está disponível e a maioria dos micro-organismos não pode crescer (BARBUT, 2002).

A avaliação do número de colônias de aeróbios mesófilos (Figura 15, BAM), para os tratamentos que receberam folhas de oliveira (T2 e T3), indicou contagens menores que T1 do 1° (6; 4; 3 \log_{10} UFC/g) aos 120 dias (2,88; 1,71; 1,34 \log_{10} UFC/g) de acompanhamento (T1, T2 e T3, respectivamente). Entre T2 e T3 também houve diferença significativa ($P < 0,05$), durante os 120 dias, indicando que 10g oliveira/kg de ração teve melhor efeito sobre o crescimento de bactérias aeróbias mesófilas. O número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas, de acordo com Cardoso et al., (2014), fornece uma estimativa da população microbiana total, e um número elevado indica baixa qualidade e reduzida vida de prateleira do alimento. De acordo com Ritter & Bergmann (2003), número de mesófilos acima de 6 \log_{10} UFC/g indica condições higiênico-sanitárias impróprias para a carne de frango. Portanto, as coxas e sobrecoxas do tratamento T1, no 1° dia de análise apresentaram número de colônias de bactérias mesófilas igual ao limite ideal de 6 \log_{10} UFC/g, e bem próximo do limite de término da vida útil (7 \log_{10} UFC/g) (ICMSF, 1986). Enquanto as coxas e sobrecoxas de T2 e

T3 apresentaram, respectivamente, número de colônias de bactérias mesófilas, 2 e 3 ciclos log menor no 1º dia e 1,16 e 1,54 ciclos log menor aos 120 dias, em relação ao tratamento T1.

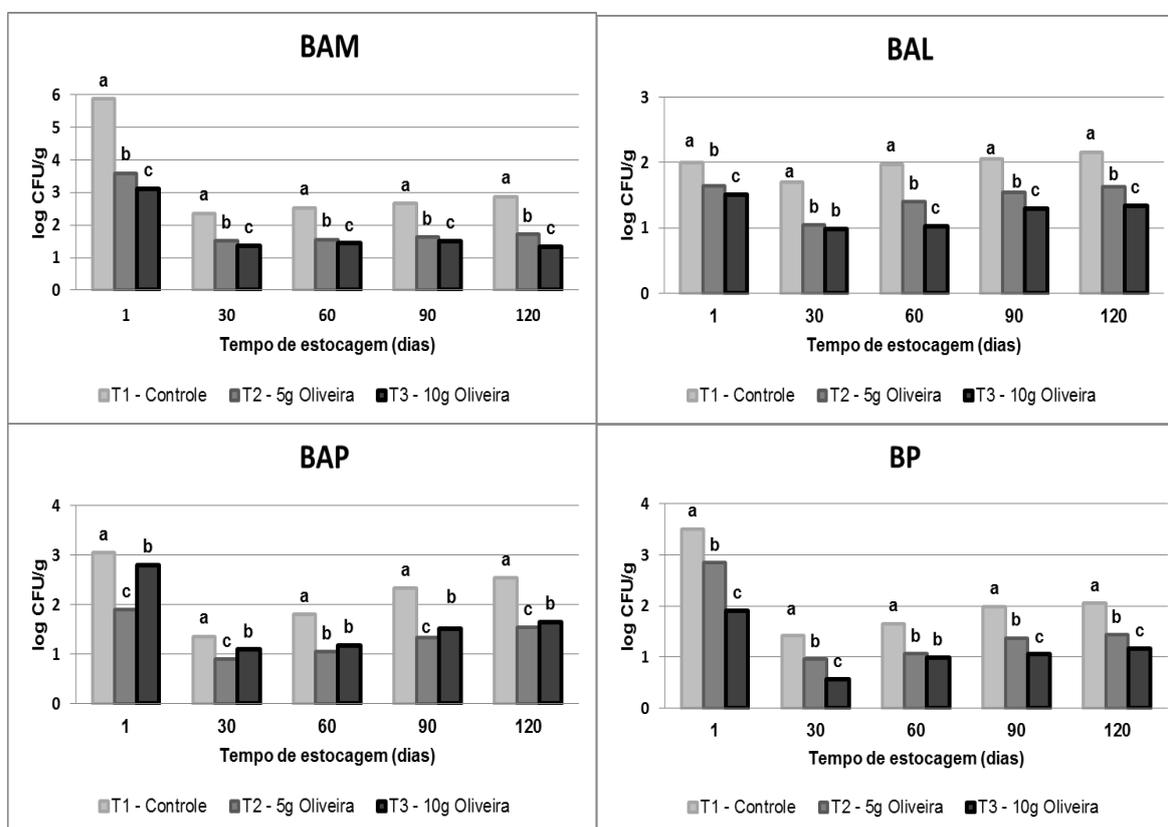


Figura 15 - Número de colônias (\log_{10} UFC/g) de bactérias aeróbias mesófilas (BAM), bactérias ácido lácticas (BAL), bactérias aeróbias psicrotróficas (BAP) e bactérias *pseudomonas* (BP), em coxas e sobrecoxas de frangos armazenadas a -18°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 120 dias.

Nota 1: a,b,c são analisadas entre T1, T2 e T3 por intervalo de análise. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

O número de colônias de bactérias ácido lácticas (Figura 15, BAL) nos tratamentos com folhas de oliveiras variou de 1,51 a 1,71 \log_{10} UFC/g em T2 e de 1,37 a 1,34 \log_{10} UFC/g em T3. Durante os 120 dias o número de colônias das coxas e sobrecoxas com folhas de oliveira foi significativamente menor ($P < 0,05$) do que o encontrado em T1 (2,36 a 2,88 \log_{10} UFC/g). O uso de 10 g de folhas de oliveira resultou em uma carne com menor número de colônias em relação a T2, demonstrando que esta concentração de folhas de oliveira administrada via dieta, apresenta melhor efeito frente as bactérias lácticas.

As coxas e sobrecoxas do tratamento T1 apresentaram o maior número de colônias de bactérias psicotróficas no 1º dia ($3 \log_{10}$ UFC/g) diferindo significativamente ($P < 0,05$) dos tratamentos T2 e T3, que apresentaram os menores valores (2 e $2,8 \log_{10}$ UFC/g, respectivamente). Aos 120 dias de acompanhamento sob armazenamento a -18°C o comportamento foi semelhante, onde T1 apresentou $2,54 \log_{10}$ UFC/g e T2 e T3 apresentaram valores significativamente menores ($1,54$ e $1,65 \log_{10}$ UFC/g, respectivamente). Considerando o limite de número de colônias de 6 a $7 \log_{10}$ UFC/g, (ICMSF, 1986) como limite para o término de vida útil das carnes de frangos as coxas e sobrecoxas dos três tratamentos mostraram-se aptas ao consumo do 1º aos 120 dias de acompanhamento. O uso de 5 e 10g de folhas de oliveiras/kg de ração proporcionaram bom efeito antimicrobiano frente às bactérias psicotróficas, pois os números de colônias nos tratamentos T2 e T3 foram 1 e 0,89 ciclos log abaixo do número de colônias do tratamento T1 aos 120 dias. Galarz (2008) ao analisar filés de peito de frangos sem nenhum antioxidante, e armazenados durante 20 dias a -18°C , encontrou número de colônias de bactérias psicotróficas de $4 \log_{10}$ UFC/g. Os tratamentos T2 e T3 apresentaram $1,54$ e $1,65 \log_{10}$ UFC/g, respectivamente aos 120 dias de armazenamento a -18°C , indicando que o uso de folhas de oliveiras na dieta de frangos foi bem eficaz no controle de bactérias psicotróficas do que quando não utilizado, uma vez que mesmo com 100 dias a mais de armazenamento, obteve-se número de colônias de bactérias psicotróficas menores do que Galarz (2008).

De acordo com Johnson (1990), as bactérias do gênero *Pseudomonas* são capazes de deteriorar alimentos proteicos mantidos em baixas temperaturas. Frazier & Westhoff (1993) também destacam a capacidade de algumas espécies de *Pseudomonas* em crescer em baixas temperaturas e possuir atividade proteolítica e lipolítica. O número de colônias de *Pseudomonas* avaliado nas coxas e sobrecoxas de frango armazenadas a -18°C , e visualizado na Figura 15-BP, indicou diferença significativa nos valores obtidos para os três tratamentos no primeiro dia de análise em relação aos demais dias de acompanhamento (30, 60, 90 e 120 dias), demonstrando que o congelamento oferece uma barreira ao desenvolvimento deste gênero de bactérias.

Os tratamentos T2 e T3 ($1,43$ e $1,17 \log_{10}$ UFC/g) apresentaram número de colônias de *Pseudomonas* significativamente menores ($P < 0,05$) do que o encontrado em T1 ($2,05 \log_{10}$ UFC/g) aos 120 dias de acompanhamento e em todos os dias anteriormente analisados, demonstrando o efeito positivo da oliveira frente este micro-organismo. A presença de bactérias do grupo coliformes a 35°C e 45°C em alimentos é interpretada como indicador de

contaminação fecal, ou seja, de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, indicando uma possível ocorrência de patógenos entéricos (CARDOSO, 2000). Desta forma, pode-se observar que as coxas e sobrecoxas dos três tratamentos analisados demonstraram-se microbiologicamente satisfatórias.

O número de colônias de coliformes totais (35°C) indicativo do grau de contaminação do ambiente em que as coxas e sobrecoxas de frango foram obtidas (CARDOSO et al, 2014) pode ser visualizado na Figura 16-CTO. Verificou-se no 1° dia de acompanhamento número de colônias de 2,64; 2,05 e 1,93 log₁₀ UFC/g e aos 120 dias de 2,38; 1,61 e 1,21 log₁₀ UFC/g para T1, T2 e T3, respectivamente. As contagens oscilaram durante os 120 dias, porém sem diferença significativa entre os períodos avaliados. Durante os 120 dias de acompanhamento, T2 e T3 apresentaram menores valores e com diferença significativa (P<0,05) de T1.

Considerando a Resolução nº12/2001 da ANVISA (BRASIL, 2001), que estabelece um limite máximo de coliformes a 45°C ou coliformes termotolerantes em carnes resfriadas e congeladas de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes) de 10⁴ NMP/g (log 5,0 NMP/g), T1 apresentou-se impróprio aos 120 dias atingindo valores de 5,04 log₁₀ UFC/g, enquanto T2 (2,43 log₁₀ UFC/g) e T3 (2,08 log₁₀ UFC/g) apresentaram número de colônias abaixo do limite permitido pela Resolução e com 2,61 e 2,96 ciclos log menores que T1, o que resultou em diferença significativa (P<0,05) entre os tratamentos. Estes resultados demonstram efeito positivo das folhas de oliveira na quantidade de 5 e 10g/kg de ração na inibição de coliformes a 45°C em coxas e sobrecoxas de frango, tendo em vista que os resultados tiveram uma variação mínima do 1° aos 120 dias de acompanhamento, conforme pode ser visualizado na Figura 16-CTE.

Para *Escherichia coli*, as coxas e sobrecoxas de T2 e T3 (1,26; 1,12 log₁₀UFC/g, respectivamente) apresentaram reduções significativas (P<0,05) das contagens aos 120 dias em relação a T1 (1,93 log₁₀UFC/g), demonstrando que o uso de oliveira em ambas as concentrações teve melhor efeito inibitório que T1, e que o uso de 10g de oliveira/kg de ração teve maior efeito inibitório que o uso de 5gde oliveira/kg de ração.

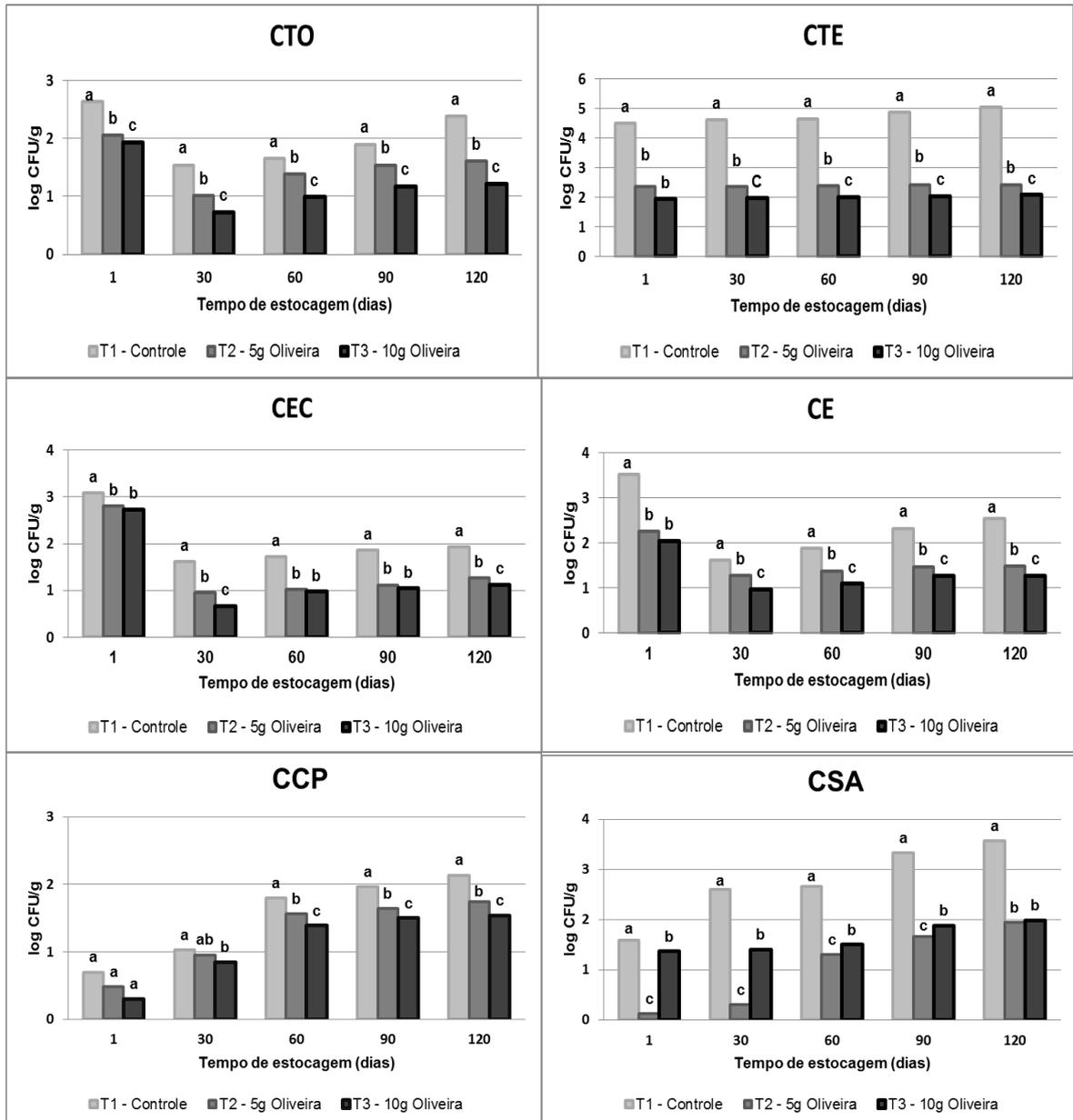


Figura 16 - Número de colônias (\log_{10} UFC/g) de Coliformes Totais (CTO), Coliformes Termotolerantes (CTE), *Escherichia coli* (CEC), *Enterococcus* spp (CE), *Clostridium perfringens* (CCP) e *Staphylococcus aureus* (CSA) em coxas e sobrecoxas de frangos armazenadas a -18°C por 120 dias.

Nota 1: a,b,c são analisadas entre T1, T2 e T3 por intervalo de análise. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

Observou-se nas coxas e sobrecoxas dos frangos que receberam folhas de oliveiras na dieta (T2 e T3), efeito antimicrobiano durante o período estudado em relação ao gênero *Enterococcus* spp. (Figura 16, CE). Decorrente disso o número de colônias de T2 e T3 em

todos os dias analisados foram menores do que os encontrados para T1, diferindo significativamente ($P < 0,05$) deste. Constatou-se que em relação ao gênero *Enterococcus* spp. T3 apresentou efeito inibitório melhor que os demais tratamentos durante os 120 dias de acompanhamento, onde ao final do acompanhamento verificou-se valores de 1,27, 1,48 e 2,55 \log_{10} UFC/g para T3, T2 e T1, respectivamente (Figura 16, CE).

O uso de folhas de oliveira na quantidade de 10g/kg de ração indicou melhor efeito inibitório que o uso de 5g/kg de ração para *Clostridium perfringens* (Figura 16, CCP), mas ambas as quantidades demonstraram capacidade inibitória significativamente ($P < 0,05$) melhor que T1. Aos 120 dias de acompanhamento, as coxas e sobrecoxas de T2 e T3 (1,74 e 1,54 \log_{10} UFC/g) apresentaram, respectivamente, redução de 0,39 e 0,59 ciclos log em relação a T1 (2,13 \log_{10} UFC/g).

As coxas e sobrecoxas do tratamento T1 apresentaram o maior número de colônias de *Staphylococcus aureus* do 1º dia (2; 0; 1 \log_{10} UFC/g) até os 120 dias (3,57; 1,94; 1,98 \log_{10} UFC/g) para T1, T2 e T3, respectivamente. Como a Legislação brasileira não limita a tolerância máxima permitida para *Staphylococcus aureus* em cortes, optou-se por utilizar o mesmo limite usado para produtos cárneos de 3,69 \log_{10} UFC/g para *Staphylococcus coagulase positiva* (BRASIL, 2001). Desta forma, percebeu-se que as coxas e sobrecoxas de T1 (3,57 \log_{10} UFC/g) chegaram próximo ao limite estabelecido pela legislação aos 120 dias de armazenamento, enquanto que o número de colônias de *Staphylococcus aureus* pertencentes a T2 (1,94 \log_{10} UFC/g) e T3 (1,98 \log_{10} UFC/g), também aos 120 dias, foram bem menores do que 3,69 \log_{10} UFC/g (BRASIL, 2001). As folhas de oliveiras adicionadas na dieta de frangos demonstraram efeito frente ao crescimento de colônias de *Staphylococcus aureus*, uma vez que os tratamentos T2 e T3 apresentaram 1,63 e 1,67 ciclos log a menos que T1 aos 120 dias. *Staphylococcus* não produtores de coagulase também podem ser produtores de enterotoxina e, portanto, estando presentes nos alimentos podem oferecer riscos ao consumidor (PEREIRA & PEREIRA, 2005). Portanto, o uso de folhas de oliveiras embora tenham mantido as amostras com menores contagens, não se pode afirmar que foram eficientes no controle de *Staphylococcus*, uma vez que apresentaram presença deste micro-organismo, o qual pode acarretar risco ao consumidor mesmo quando presente em baixas concentrações, pois pode produzir toxina.

Para as coxas e sobrecoxas armazenadas congeladas dos três tratamentos, não foi verificada presença de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Klebsiela*, *Yersinia*, e *Streptococcus*.

Como neste estudo, autores também comprovaram efeito microbiano exercido pelas folhas de oliveira. Ao avaliar o efeito antimicrobiano de folhas de oliveira em comparação ao alecrim suplementados via dieta de perus, Govaris et al., (2010) verificou capacidade antimicrobiana significativamente superior das folhas de oliveira frente ao alecrim e ao tratamento controle para todas as bactérias avaliadas (Enterobacterias, ácido láticas, psicotróficas e contagem total) na carne de peito refrigerada a 4°C por 12 dias. Ahmed et al., (2014) ao avaliar o efeito antibacteriano de extrato de folhas de oliveira em camarões verificou redução na contagem de bactérias totais e coliformes.

Pereira et al., (2007) relataram que as folhas de oliveira possuem capacidade antimicrobiana na seguinte ordem *Bacillus cereus*>*Candida albicans*>*E. coli*>*S. aureus*>*P. aeruginosa*. Eles também relatam que o mecanismo antimicrobiano das folhas de oliveira ocorre por meio da desnaturação proteica e da alteração da permeabilidade da membrana celular. Efeito positivo também foi verificado por Lee & Lee (2010) onde uma mistura de compostos fenólicos preparada a partir de folhas de oliveira demonstrou inibição frente *B. cereus* e *S. enteritidis*. Owen et al., (2003) também relatou que as folhas de oliveira apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. typhi* e *V. parahaemolyticus*. Os resultados do nosso estudo apresentaram semelhança aos estudos realizados por Owen et al., (2003); Pereira et al. (2007); Lee & Lee (2010); Govaris et al., (2010) com relação a atividade antimicrobiana das folhas de oliveira, o que conforme mencionado por Govaris et al., (2010) recomenda o uso de folhas de oliveira como suplemento nutricional ou componente funcional de alimentos, ou Gökmen et al., (2014) que indica o uso de folhas de oliveira pela indústria de alimentos como um antimicrobiano natural.

5.8. AVALIAÇÃO SENSORIAL DAS COXAS E SOBRECoxAS ARMAZENADAS CONGELADAS

Para análise sensorial das coxas e sobrecoxas de frango foi realizado descongelamento das amostras por 12 horas em refrigerador a temperatura de 4 a 8°C. As amostras foram avaliadas pelos degustadores após preparo em forno a 180°C. Os resultados da análise de ADQ realizada ao longo de 120 dias está apresentada na Tabela 21 (30 e 60 dias) e Tabela 22 (90 e 120 dias).

Tabela 21 - Valores médios da análise de ADQ das coxas e sobrecoxas de frango com 30 e 60 dias de armazenamento congelado a -18°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Atributos avaliados	Intervalo de Análise					
	30 dias de Avaliação			60 dias de Avaliação		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Intensidade da cor verde	2,313 ^b ($\pm 0,015$)	4,680 ^a ($\pm 0,010$)	4,873 ^a ($\pm 0,006$)	2,353 ^b ($\pm 0,015$)	4,653 ^a ($\pm 0,006$)	4,823 ^a ($\pm 0,006$)
brilho	4,223 ^a ($\pm 0,006$)	4,147 ^b ($\pm 0,006$)	4,270 ^a ($\pm 0,010$)	4,120 ^a ($\pm 0,010$)	4,020 ^{a,b} ($\pm 0,010$)	3,900 ^b ($\pm 0,100$)
cor clara	0,683 ^b ($\pm 0,006$)	0,757 ^b ($\pm 0,006$)	1,240 ^a ($\pm 0,010$)	0,633 ^b ($\pm 0,006$)	0,713 ^b ($\pm 0,006$)	1,167 ^a ($\pm 0,058$)
cor amarelada	3,750 ^a ($\pm 0,010$)	3,840 ^a ($\pm 0,017$)	3,667 ^b ($\pm 0,006$)	3,720 ^a ($\pm 0,010$)	3,777 ^a ($\pm 0,015$)	3,610 ^b ($\pm 0,010$)
cor esverdeada	2,400 ^b ($\pm 0,100$)	4,660 ^a ($\pm 0,010$)	6,223 ^a ($\pm 0,006$)	2,700 ^c ($\pm 0,100$)	4,620 ^b ($\pm 0,010$)	6,170 ^a ($\pm 0,010$)
odor de frango	5,820 ^a ($\pm 0,010$)	4,643 ^b ($\pm 0,006$)	4,520 ^b ($\pm 0,010$)	5,983 ^a ($\pm 0,064$)	4,627 ^b ($\pm 0,006$)	4,467 ^b ($\pm 0,058$)
odor de azeite de oliva	0,000 ^b ($\pm 0,000$)	5,940 ^a ($\pm 0,010$)	7,453 ^a ($\pm 0,012$)	0,000 ^b ($\pm 0,000$)	5,927 ^a ($\pm 0,006$)	7,410 ^a ($\pm 0,010$)
odor de ranço	2,340 ^a ($\pm 0,010$)	0,843 ^b ($\pm 0,006$)	0,940 ^b ($\pm 0,010$)	2,420 ^a ($\pm 0,010$)	0,860 ^b ($\pm 0,010$)	0,947 ^b ($\pm 0,006$)
textura succulenta	5,083 ^a ($\pm 0,015$)	5,300 ^b ($\pm 0,100$)	5,12 ^a ($\pm 0,010$)	4,967 ^a ($\pm 0,015$)	5,033 ^a ($\pm 0,058$)	5,100 ^a ($\pm 0,100$)
textura rígida	4,863 ^a ($\pm 0,012$)	4,567 ^b ($\pm 0,015$)	4,550 ^b ($\pm 0,010$)	4,863 ^a ($\pm 0,006$)	4,553 ^a ($\pm 0,006$)	4,527 ^b ($\pm 0,006$)
Sabor frango fresco	6,840 ^b ($\pm 0,010$)	7,633 ^a ($\pm 0,006$)	7,537 ^a ($\pm 0,006$)	6,740 ^b ($\pm 0,010$)	7,600 ^a ($\pm 0,100$)	7,510 ^a ($\pm 0,010$)
sabor ranço	3,180 ^a ($\pm 0,010$)	1,200 ^b ($\pm 0,100$)	1,317 ^b ($\pm 0,015$)	3,217 ^a ($\pm 0,006$)	1,267 ^b ($\pm 0,058$)	1,317 ^b ($\pm 0,006$)
sabor ácido	2,500 ^a ($\pm 0,100$)	1,840 ^b ($\pm 0,010$)	1,647 ^b ($\pm 0,006$)	2,833 ^a ($\pm 0,058$)	1,870 ^b ($\pm 0,010$)	1,680 ^b ($\pm 0,010$)
sabor de azeite de oliva	0,000 ^b ($\pm 0,000$)	6,437 ^a ($\pm 0,006$)	8,153 ^a ($\pm 0,015$)	0,000 ^a ($\pm 0,000$)	6,383 ^b ($\pm 0,006$)	8,047 ^b ($\pm 0,006$)

Nota 1: a,b,c são analisadas na horizontal entre T1, T2 e T3 por intervalo de análise. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

O atributo odor de ranço para os tratamentos que receberam folhas de oliveira, T2 e T3, dos 30 (0,843; 0,940) aos 120 dias (0,870; 0,977) respectivamente, aumentou quando comparado ao 1º dia de análise (Tabela 15, 1º dia), onde foi verificado valores de 0,5 e 0,8 para T2 e T3. Para T1 este atributo também sofreu aumento do 1º dia (1,4) para os 30 (2,34) e 120 dias (2,55). Estes resultados indicam que T1 e T2 aumentaram a nota de odor de ranço em média 67 e 68% aos 30 dias e 85 e 74% aos 120 dias, respectivamente, enquanto T3 aumentou

apenas 17% nos 30 dias e 22% nos 120 dias, indicando que o uso de 10g de folhas de oliveira foi efetivo para este atributo.

Tabela 22 - Valores médios da análise de ADQ das coxas e sobrecoxas de frango com 90 e 120 dias de armazenamento congelado a -18°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$).

Atributos avaliados	Intervalo de Análise					
	90 dias de Avaliação			120 dias de Avaliação		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Intensidade da cor verde	2,380 ^b	4,623 ^a	4,787 ^a	2,420 ^b	4,560 ^a	4,650 ^a
	($\pm 0,010$)	($\pm 0,006$)	($\pm 0,006$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)
brilho	4,017 ^a	3,833 ^b	4,000 ^{a,b}	3,933 ^a	3,700 ^a	3,800 ^{a,b}
	($\pm 0,012$)	($\pm 0,058$)	($\pm 0,100$)	($\pm 0,058$)	($\pm 0,100$)	($\pm 0,100$)
cor clara	0,583 ^b	0,683 ^b	1,020 ^a	0,560 ^c	0,650 ^b	0,923 ^a
	($\pm 0,006$)	($\pm 0,006$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,006$)
cor amarelada	3,633 ^b	3,750 ^a	3,583 ^b	3,533 ^a	3,450 ^{a,b}	3,383 ^b
	($\pm 0,058$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,006$)	($\pm 0,058$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,006$)
cor esverdeada	3,100 ^c	4,590 ^b	6,047 ^a	3,600 ^c	4,550 ^b	5,833 ^a
	($\pm 0,100$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,012$)	($\pm 0,100$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,058$)
odor de frango	6,120 ^a	4,633 ^b	4,267 ^b	6,183 ^a	4,400 ^b	3,967 ^c
	($\pm 0,010$)	($\pm 0,058$)	($\pm 0,115$)	($\pm 0,006$)	($\pm 0,100$)	($\pm 0,115$)
odor de azeite de oliva	0,000 ^c	5,870 ^b	7,357 ^a	0,000 ^c	5,820 ^b	6,467 ^a
	($\pm 0,000$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,012$)	($\pm 0,000$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,058$)
odor de ração	2,467 ^a	0,853 ^b	0,967 ^b	2,550 ^a	0,870 ^b	0,977 ^b
	($\pm 0,012$)	($\pm 0,006$)	($\pm 0,012$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,012$)
textura succulenta	5,017 ^b	5,020 ^b	5,200 ^a	4,967 ^a	4,980 ^a	4,967 ^a
	($\pm 0,006$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,100$)	($\pm 0,012$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,115$)
textura rígida	4,830 ^a	4,477 ^b	4,467 ^b	4,900 ^a	4,410 ^b	4,427 ^b
	($\pm 0,010$)	($\pm 0,006$)	($\pm 0,015$)	($\pm 0,100$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,012$)
Sabor frango fresco	6,683 ^b	7,267 ^a	7,430 ^a	6,470 ^b	7,100 ^a	7,393 ^a
	($\pm 0,006$)	($\pm 0,058$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,100$)	($\pm 0,006$)
sabor ração	3,383 ^a	1,233 ^b	1,300 ^b	3,453 ^a	1,250 ^b	1,380 ^b
	($\pm 0,006$)	($\pm 0,006$)	($\pm 0,100$)	($\pm 0,006$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)
sabor ácido	3,133 ^a	1,863 ^b	1,783 ^b	3,567 ^a	1,920 ^b	1,813 ^b
	($\pm 0,058$)	($\pm 0,006$)	($\pm 0,012$)	($\pm 0,058$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,006$)
sabor de azeite de oliva	0,000 ^a	6,253 ^b	7,947 ^b	0,000 ^c	6,180 ^b	7,850 ^a
	($\pm 0,000$)	($\pm 0,006$)	($\pm 0,015$)	($\pm 0,000$)	($\pm 0,010$)	($\pm 0,010$)

Nota 1: a,b,c são analisadas na horizontal entre T1, T2 e T3 por intervalo de análise. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Nota 2: (T1) dieta controle, (T2) dieta suplementada com 5g oliveira/kg de ração, (T3) dieta suplementada com 10g oliveira/kg de ração.

O sabor de ração nas coxas e sobrecoxas de frango aumentou com o tempo para T1, apresentando valores de 2,413 no 1º dia e 3,453 aos 120 dias (Tabela 15, 1º dia). O tratamento que recebeu 5g de folhas de oliveira iniciou com valores de 0,767 e atingiu 1,25

aos 120 dias. T3 iniciou com 1,57 reduzindo para 1,38 aos 120 dias. Em todos os períodos de análise (Tabelas 15, 21 e 22) T2 e T3 apresentaram valores significativamente menores de sabor e odor de ranço em relação a T1, indicando que as folhas de oliveira possuem capacidade de retardar o desenvolvimento de sabores e odores de ranço.

Para os atributos sabor e odor de azeite de oliva os degustadores atribuíram inicialmente (Tabela 15, 1º dia) notas altas para T2 (7,967 e 7,833) e T3 (9,167 e 8,637), sendo estes significativamente ($P < 0,05$) diferentes entre si e quando comparados a T1 (0,500 e 0,083), indicando que a incorporação de oliveira na ração da dieta dos frangos contribuiu para a modificação do sabor e odor da carne das coxas e sobrecoxas, conferindo notas sensoriais que não foram percebidas em T1. Aos 120 dias as notas de sabor e odor de azeite de oliva para T1 (0,0 e 0,0), T2 (6,180 e 5,820) e T3 (7,850 e 6,467) respectivamente, foram menores quando comparadas a avaliação sensorial inicial, demonstrando que os componentes foram degradados durante a vida de prateleira das coxas e sobrecoxas armazenadas congeladas.

Inicialmente, para o atributo intensidade da cor verde e cor esverdeada, T2 (4,367 e 6,4) e T3 (5,233 e 7,333) tiveram valores significativamente ($P < 0,05$) maiores que o T1 (2,100 e 1,733), (Tabela 15, 1º dia), indicando que a adição de oliveira via dieta dos frangos proporcionou alteração na coloração da carne, pois quanto maior foi o percentual de adição de oliveira na ração, maiores foram às notas atribuídas pelos degustadores aos tratamentos. Aos 120 dias de acompanhamento (Tabela 22, 120 dias), os atributos intensidade da cor verde e cor esverdeada, para T2 (4,560 e 4,550) e T3 (4,650 e 5,833) apresentaram degradação em relação às análises anteriores, e aumento para T1 (2,420 e 3,600). Estes resultados indicam que a oliveira interfere positivamente na coloração das coxas e sobrecoxas de frango, pois os atributos de intensidade da cor verde e cor esverdeada, indicativos de oxidação do pigmento heme, aumentaram para T1 com o passar do tempo e os valores de T2 e T3 reduziram, muito provável pela degradação da pigmentação verde inicialmente conferido pelas folhas de oliveira às coxas e sobrecoxas de frango. A coloração da pele das coxas e sobrecoxas dos frangos avaliada pelo atributo coloração clara indicou no 1º dia, o T1 (0,543) como o mais claro e T3 (1,133) como o menos claro, sendo que T3 diferiu significativamente ($P < 0,05$) de T1 e T2 (0,817) (Tabela 15, 1º dia). Ao longo do acompanhamento a cor clara alterou atingindo valores de 0,560; 0,650 e 0,923 para T1, T2 e T3, demonstrando que as peles das coxas e sobrecoxas com folhas de oliveira sofreram um leve escurecimento em relação a T1.

O atributo brilho avaliado nas coxas e sobrecoxas de frango indicou inicialmente (Tabela 15, 1º dia) maior intensidade do atributo pelos tratamentos T2 (4,567) e T3 (4,813) em relação a T1 (4,533). Porém ao longo do acompanhamento os valores alteraram, finalizando muito próximos entre os tratamentos T1, T2 e T3 (3,93; 3,70 e 3,80 respectivamente).

A coloração amarelada referente à gordura proveniente das coxas e sobrecoxas de frango indicou coloração inicial mais intensa para os Tratamentos T2 (3,867) e T3 (3,800) os quais apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) em relação a T1 (3,600) No decorrer do acompanhamento o pigmento amarelo degradou nos tratamentos T2 e T3 em relação a T1, sendo que ao final de 120 dias os valores ficaram próximos entre os tratamentos T1, T2 e T3 (3,533; 3,450 e 3,383).

A textura das coxas e sobrecoxas de frango, avaliada através dos atributos suculência e rigidez, indicou inicialmente maiores valores de suculência para T2 (5,283 e 4,6) e T3 (5,4 e 4,767) sendo estes significativamente ($P < 0,05$) mais suculentos que T1 (5,073 e 4,977). A maior suculência dos tratamentos que receberam folhas de oliveira manteve-se durante os 120 dias de acompanhamento, porém não foi significativa entre os tratamentos. Já a rigidez apresentou-se significativamente ($P < 0,05$) maior para T1 (4,9) aos 120 dias em relação a T2 (4,41) e T3 (4,427).

Para o atributo sabor de frango fresco, T1 (7,767) recebeu inicialmente as menores notas (Tabela 15, 1º dia), sendo significativamente ($P < 0,05$) diferente de T2 (7,9) e T3 (8,367), o que é indicativo de que T1 perdeu o frescor inicial da carne já no primeiro dia de análise. O sabor de frango fresco manteve-se significativamente ($P < 0,05$) maior para os tratamentos que receberam folhas de oliveira até os 120 dias, (6,47; 7,10 e 7,393 para T1, T2 e T3, respectivamente), (Tabela 22), demonstrando que a oliveira proporcionou melhora deste atributo nas coxas e sobrecoxas de frango.

Para o atributo odor de frango, T1 (6,2; 6,183) teve no 1º e aos 120 dias de análise, respectivamente, maior nota comparada a T2 (4,967; 4,4) e T3 (4,3; 3,967), demonstrando que a adição de folhas de oliveira na ração da dieta dos frangos proporcionou um maior tempo de frescor da carne, sem aumentar seu odor de frango, que está associado à alteração organoléptica de produto.

O atributo sabor ácido, também foi influenciado pela inclusão de folhas de oliveira via dieta dos frangos, onde as coxas e sobrecoxas, do 1º até os 120 dias de acompanhamento, para T2 (1,167 e 1,920) e T3 (1,970 e 1,813) apresentaram valores significativamente

($P < 0,05$) menores que T1 (3,413 e 3,567), indicando que o uso de oliveira via dieta preservou as características sensoriais dos cortes avaliados.

5.9. AVALIAÇÃO DO PERFIL SANGUÍNEO DE RATOS

Foi realizada desossa da carne das coxas e sobrecoxas dos frangos dos três tratamentos e liofilização em aparelho marca Edwards. Esta matéria-prima serviu de composição para elaboração da ração de quatro tratamentos conforme Tabela 23. A ração padrão de roedores foi suplementada com 20% de carne de frango proveniente dos diferentes tratamentos dos frangos, sendo esta quantidade de proteína recomendada, em média, para manutenção de roedores adultos (REEVES, NIELSEN & FAHEY Jr, 1993). A ração moída foi misturada à carne liofilizada, umidificada, compactada na forma de pellet (manualmente) e seca em estufa (40 a 60°C por 3h).

Tabela 23 – Ração realizada para os quatro Tratamentos de ratos *Wistar*.

Tratamento	Ração (g)
CN	Controle negativo (ração padrão roedores)
T1	ração suplementada com 20% de carne de frango com alimentação convencional
T2	ração suplementada com 20% de carne de frango suplementada com 5g de folhas de oliveira
T3	ração suplementada com 20% de carne de frango suplementada com 10g de folhas de oliveira

Foram selecionados 48 ratos *Wistar* machos de 180 a 220g de peso corporal. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 12 indivíduos cada, e foram alojados em gaiolas, onde receberam água e ração *ad libitum* e foram submetidos ao controle artificial de ciclos de luminosidade (12 horas de luz x 12 horas de escuro), controle de temperatura de 22°C, e exatidão em condições de biotério. O consumo de ração e água suplementada aos

animais está apresentado na Tabela 24 e indicam consumo semelhante de ração e água entre os 4 tratamentos realizados, demonstrando que as rações elaboradas com carne de coxas e sobrecoxas de frangos alimentados com folhas de oliveira (T2 e T3) tiveram boa aceitação sensorial, e sem diferença significativa dos outros tratamentos. Durante a exposição não foram observados sintomas de toxicidade clínica como: alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorreia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões ou hiperexcitabilidade do sistema nervoso central.

Após os 25 dias de exposição à ração suplementada os animais foram anestesiados com 50 mg/kg da mistura de tiletamina e zolazepam (Zoletil 50®) por via intraperitoneal (volume de injeção de 0,1 mL). O sangue total foi coletado (aproximadamente 10 mL) com seringa e agulha da artéria abdominal. Uma alíquota de sangue (aproximadamente 3 mL) foi enriquecida com solução de EDTA a 10% para análise hematológica e o restante foi utilizado para separação do soro (após coagulação e centrifugação a 3000 rpm).

Tabela 24 - Valores médios do consumo de ração e água suplementada aos ratos durante 25 dias.

Grupos	Ração (g)	Água (mL)	Peso final dos animais (g)
CN	662,8 ^a (±197,2)	456,1 ^a (±262,3)	235,7 ^a (±22,0)
T1	665,3 ^a (±217,7)	460,4 ^a (±231,4)	265,6 ^a (±23,1)
T2	666,6 ^a (±187,5)	427,1 ^a (±254,6)	249,7 ^a (±28,8)
T3	648,4 ^a (±200,0)	483,3 ^a (±281,4)	267,8 ^a (±25,1)

Nota: a,b,c são analisadas na vertical entre CN, T1, T2 e T3 por intervalo de análise. Letras diferentes apresentam diferença significativa (P<0,05) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Os grupos de animais que receberam ração suplementada com carne de frangos alimentados com folhas de Oliveira (T2 e T3) apresentaram ganho de peso semelhante aos ratos alimentados com ração sem folhas de oliveira (T1). Verificou-se maior ganho de peso nos animais que receberam ração com carne de frangos que receberam 10g de folhas de oliveira na alimentação (T3), porém, sem diferença significativa para os demais Tratamentos.

A Tabela 25 apresenta os resultados dos índices hematimétricos dos animais dos diferentes Tratamentos.

Tabela 25 - Índices hematimétricos dos ratos dos diferentes Tratamentos.

Parâmetro	CN	T1	T2	T3	Valores referência*
Leucócitos totais ($10^3/\text{mL}$)	8,8 ^a (±1,7)	8,3 ^a (±2,2)	7,7 ^a (±2,8)	6,4 ^a (±1,1)	14
Linfócitos (%)	81,41 ^a (±3,8)	83,4 ^a (±4,5)	83,2 ^a (±3,7)	84,9 ^a (±2,3)	73
Monócitos (%)	13,7 ^a (±2,5)	11,2 ^a (±2,4)	12,3 ^a (±2,2)	11,9 ^a (±1,9)	-
Granulócitos (%)	4,9 ^a (±2,0)	5,4 ^a (±2,6)	4,5 ^a (±1,8)	3,3 ^a (±0,9)	22
Hemáceas ($10^6/\text{mL}$)	7,0 ^a (±0,4)	8,1 ^a (±1,1)	6,7 ^a (±0,6)	6,7 ^a (±0,3)	7,2-9,8
Hemoglobina (g/dL)	13,1 ^a (±1,5)	16,0 ^a (±2,1)	13,5 ^a (±1,0)	13,3 ^a (±0,3)	14,8
Hematócrito (%)	39,2 ^a (±2,0)	45,7 ^a (±6,1)	37,7 ^a (±3,4)	36,9 ^a (±1,3)	46
Plaquetas ($10^3/\text{mL}$)	648,0 ^a (±69,2)	544,5 ^a (±168,7)	660,8 ^a (±81,4)	647,1 ^a (±69,2)	702-796

* CCAC (1993).

Nota: a,b,c são analisadas na horizontal entre CN, T1, T2 e T3 por intervalo de análise. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. O desvio padrão encontra-se entre parênteses.

Os animais pertencentes a T1 apresentaram valores aumentados do número de hemáceas, índice de hemoglobina e hematócrito em relação aos demais tratamentos. Os grupos de animais que receberam ração suplementada com carne de frangos alimentados com folhas de Oliveira (T2 e T3) apresentaram valores hematológicos dentro da normalidade para ratos e sem diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos animais que receberam ração convencional (T1).

A glicose elevada encontrada em T2 poderia ser atribuída à falta de jejum no momento da coleta do sangue para as dosagens. Entretanto, como todos os animais foram mantidos da mesma forma, tanto os alimentados com carne de frango contendo folhas de oliveiras como os controles, este fato não explica a diferença observada. O aumento da glicose pode estar

associado ao aumento da quantidade de gordura corporal e hormônios hiperglicemiantes (BORBA et al., 2012).

A elevação nos níveis de HDL-colesterol e a diminuição do LDL-colesterol são benéficas para o organismo, pois o LDL fornece colesterol aos tecidos e HDL remove o excesso de colesterol das células que, depois de transportado para o fígado, pode ser excretado (Marzzoco, 1999) e, baixos níveis de HDL podem contribuir para a formação de aterosclerose (Katzung, 1998). Em nosso estudo foi verificado aumento dos níveis de HDL para T2 e T3 (32,9 e 35,3 mg/dL) em relação a NC e T1 (27,4 e 32,5 mg/dL) indicando que as folhas de oliveira podem ter efeito positivo frente este parâmetro. O nível de LDL indicou aumento significativo para T2 (25 mg/dL) em relação aos demais tratamentos 14,6; 16,3 e 14,6 para NC, T1 e T3, respectivamente. Os ratos que receberam carne de frangos alimentados com folhas de Oliveira (T2 e T3) apresentaram níveis mais altos de colesterol total em comparação aos animais que receberam ração padrão de roedores (CN e T1), porém dentro da faixa de normalidade para ratos Wistar machos. É interessante observar que o maior índice do bom colesterol (HDL) se apresenta no grupo de ratos que receberam carne de frango suplementada com 10% de Oliveira (T3), e o nível do colesterol envolvido na arterosclerose (LDL), neste mesmo grupo, é igual ao nível do LDL colesterol dos animais que receberam ração padrão de roedores (CN), fato que coloca a carne de frango que recebeu 10g de folhas de Oliveira como um promissor alimento funcional, justificando investimento nestes estudos. A análise de triglicérides indicou redução significativa dos valores de T2 (61,1 mg/dL) em relação a CN, T1 e T3 (71,7; 76,9 e 83,5 mg/dL).

O perfil renal foi avaliado pela determinação dos níveis séricos de uréia, ácido úrico e creatinina. Segundo Trabelsi et al.,(2011) o valor elevado de creatinina para T2 (0,54 mg/dL) sérica pode ser atribuído à desidratação. Pode-se supor que no nosso estudo o menor consumo de líquidos pelo grupo experimental T2, tenha gerado um quadro de hipoidratação e provocado aumento da creatinina. Os níveis de uréia foram significativamente maiores para os ratos que receberam alimentação com carne de frango T1, T2 e T3 (55; 57,2 e 51 mg/dL) em relação ao tratamento CN (46,3 mg/dL). De acordo com Lima, (2003), uma dieta rica em proteínas irá provocar um excesso de aminoácidos nos tecidos, o qual é utilizado como fonte de energia e neoglicogênese, liberando uréia contendo nitrogênio proveniente do metabolismo das proteínas formadas no fígado a partir da amônia. Este dado explica a diferença significativa ocorrida nos tratamentos que receberam uma fonte proteica extra na suplementação, com 20% de carne de frango da ração padrão de roedores (T1, T2 e T3).

Na Tabela 26 estão apresentados os resultados do Perfil Bioquímico do soro dos animais dos diferentes Tratamentos realizados.

Tabela 26 - Perfil bioquímico do soro dos ratos dos diferentes Tratamentos.

Parâmetro	CN	T1	T2	T3	Valores referência*
Glicose (mg/dL)	293,4 ^b (±20,7)	271,0 ^b (±53,4)	320,5 ^a (±93,0)	291,1 ^b (±32,6)	63-176
Uréia (mg/dL)	46,3 ^b (±4,0)	55,0 ^a (±5,5)	57,2 ^a (±6,4)	51,0 ^a (±4,6)	-
Creatinina (mg/dL)	0,43 ^b (±0,04)	0,49 ^b (±0,05)	0,54 ^a (±0,08)	0,48 ^b (±0,04)	-
Colesterol total (mg/dL)	56,5 ^b (±7,3)	64,1 ^b (±6,5)	70,1 ^a (±7,5)	66,1 ^b (±7,1)	26-82
HDL Colesterol (mg/dL)	27,4 ^b (±4,3)	32,5 ^a (±2,5)	32,9 ^a (±2,4)	35,3 ^a (±11,9)	-
LDL Colesterol (mg/dL)	14,6 ^b (±5,6)	16,3 ^b (±7,0)	25,0 ^a (±7,1) ^d	14,6 ^b (±5,6)	-
Triglicerídios (mg/dL)	71,7 ^a (±30,2)	76,9 ^a (±23,7)	61,1 ^b (±23,4)	83,5 ^a (±22,4)	-
Ácido úrico (mg/dL)	1,7 ^b (±0,3)	2,2 ^a (±1,0)	2,5 ^a (±1,9)	1,7 ^b (±0,3)	-
AST (U/L)	151,5 ^b (±20,4)	194,9 ^a (±45,2)	173,8 ^b (±20,2)	160,4 ^b (±26,8)	23-48
ALT (U/L)	59,3 ^b (±5,5)	55,3 ^b (±5,2)	63,2 ^a (±10,7)	58,9 ^b (±10,5)	20-24
Fosfatase alcalina (U/L)	201,5 ^a (±29,5)	207,7 ^a (±28,9)	213,9 ^a (±27,9)	213,3 ^a (±28,0)	10-28
Proteínas totais (g/dL)	6,2 ^a (±0,3)	6,1 ^a (±0,2)	6,3 ^a (±0,2)	6,2 ^a (±0,2)	4-8,6

* CCAC (1993).

A fosfatase alcalina é uma enzima presente nos canalículos biliares, túbulos renais, baço, ossos e placenta, sendo que a forma predominante no soro sanguíneo é referente ao fígado e ossos, podendo apresentar elevação no caso de cirrose hepática (MOTTA, 2003). O consumo de carne de frangos alimentados com folhas de oliveira por 25 dias, não alterou a atividade da fosfatase alcalina, verificando-se resultados de 201,5; 207,7; 213,9 e 213,3 para CN, T1, T2 e T3, respectivamente. Da mesma forma, no estudo de Melo et al. (2007), a

ingestão da infusão de erva-mate (110 g.L^{-1}) por duas semanas não alterou o perfil hepático de ratos.

As análises de proteínas não apresentaram alteração fora da normalidade ou alteração relacionada à suplementação com a carne de frango que recebeu folhas de Oliveira.

Os marcadores de função hepática foram medidos pelas enzimas AST e ALT. A enzima AST é uma enzima encontrada em maior quantidade nas mitocôndrias, cerca de 80%, e não é liberada tão rápido como a ALT, que é uma enzima puramente citosólica. A AST está presente em altas concentrações em um grande número de tecidos, como coração, fígado, músculo esquelético, rins e pâncreas. A ALT é primariamente limitada ao citosol dos hepatócitos, é considerada um indicador altamente sensível de dano hepatocelular e, dentro de certos limites, pode fornecer uma taxa quantitativa do grau de danificação sofrido pelo fígado (AL-HABORI; STAHMANN, 2002). Foi verificado aumento dos níveis de ALT de T2 e T3 (63,2 e 58,9 U/L) em relação ao T1 (55,3 U/L). Os níveis de AST para T2 e T3 (173,8 e 160,4 U/L) permaneceram abaixo do valor de T1 (194,9 U/L). Dessa forma, o aumento na atividade da enzima ALT, para os grupos de animais alimentados com folhas de oliveira (T2 e T3), deve-se provavelmente a uma lesão dos hepatócitos dos fígados destes animais, não sendo grave o bastante para provocar o aumento também da enzima AST quando comparada a T1, demonstrando que as folhas de oliveira não têm efeito tóxico sobre a função hepática, nas concentrações utilizadas.

6. CONCLUSÕES

As folhas de oliveira da variedade Ascolano apresentaram elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados destacando-se o alfa-linolênico.

Verificou-se redução da taxa de mortalidade dos frangos que tiveram dietas suplementadas com folhas de oliveira e a concentração de 5g de folhas/kg de ração proporcionou melhoria da conversão alimentar em relação ao tratamento controle.

O uso de 5 e 10g de folhas de oliveira reduziu significativamente ($p < 0,05$) o número de colônias (\log_{10} UFC/g) das bactérias deteriorantes e patógenas em relação ao tratamento controle nas coxas e sobrecoxas armazenadas resfriadas e congeladas.

Houve redução da oxidação lipídica e proteica das coxas e sobrecoxas de frango que tiveram dieta suplementada com folhas de oliveira e foram armazenadas congeladas.

A análise sensorial de ADQ indicou menor percepção dos atributos de sabor e odor de ranço nas coxas e sobrecoxas que receberam adição de folhas de oliveira via dieta, e indicou melhora dos atributos relacionados à textura nestes tratamentos em relação ao controle, tanto nas coxas e sobrecoxas armazenadas resfriadas, como nas congeladas. A intensão de compra indicou preferência das coxas e sobrecoxas armazenadas resfriadas que receberam dieta com folhas de oliveira em relação ao tratamento controle.

Os ratos expostos à carne de frangos alimentados com folhas de Oliveira não indicaram toxicidade clínica e hematológica nos parâmetros bioquímicos analisados.

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a época do ano que proporciona maior concentração de compostos fenólicos nas folhas de oliveira;
- Avaliar o volume nacional de resíduo de folhas de oliveira com vistas a obtenção de produto nacional;
- Sugerem-se novos estudos com as folhas de oliveira perfil bioquímico de ratos;
- Realizar produtos industrializados com a carne proveniente de animais tratados com ração suplementada de folhas de oliveira;
- Fazer análise da economia gerada pelo uso de folhas de oliveira veiculada a ração de frangos;
- Realizar acompanhamento de vida de prateleira por 365 dias para a carne congelada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANEH, I.; YATEEM, H.; AL RIMAWI, F. Effect of Olive Leaves Drying on the Content of Oleuropein. **Scientific Research**. v.6, n.3. 2015.

AHMAD-QASEM, M., CÁNOVAS, J., BARRAJÓN-CATALÁN, E., MICOL, V., CÁRCEL, J., GARCÍA-PÉREZ, J. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.17, p.120-129. 2013.

AHMED, A.M.; RABII, N.S.; GARBAJ, A.M.; ABOLGHAIT, S.K. Antibacterial effect of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract in raw peeled undeveined shrimp (*Penaeus semisulcatus*). **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v.2, p.53-56, 2014.

AJUYAH, A.O., R.T. HARDIN, AND J.S. SIM. Dietary antioxidant and storage affect chemical characteristics of ω -3 fatty acid enriched broiler chicken meats. **Journal Food Science**. v.58, p.43–46. 1993.

AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, A.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **Ethno-Pharmacology**, v.83, p.209-217, 2002.

ALLEN, C.E.; FOEGEDING, E.A. Some lipid characteristics and interations in muscle foods. A review. **Food Technology**. v.35, p.253-257. 1981.

ALTIOK, E., BAYÇIN, D., BAYRAKTAR, O., ULKU, S. Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. **Separation and Purification Technology**, v.62, p.342-348. 2008.

AMADOR, S.A. **Aspectos físicos da carne do peito, da coxa e da sobrecoxa de frango alimentados com dietas contendo antioxidantes naturais**. Monografia – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília, 2013. 40f.

ANIMAL FEEDING STUFFS – **Determination of amino acids content** (EN ISO 13903) 2005.

ANVISA - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Informe Técnico n. 42/2010. Disponível em: <www.portal.anvisa.gov.br>. Acesso em 19 fev. 2012.

AOAC Association of Oficial Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC international**. 18. Ed. Gaithersburg: AOAC International. 2003.

AOCS - **Official Methods and Recommended Pratices of the American Oil Chemistis Society**. Washington, 2004.

ARDITO, E.F.G.; ALVES, R.M.V. **Embalagens para alimentos congelados**. Coletânea do Instituto Tecnológico de Alimentos, v.24, n.1, p.11-28. 1994.

ARTAJO, L.S., ROMERO, M.P., MORELLOA, J.R., MOTILVA, M.J. Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds; evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index. **J. Agric. Food Chemistry**. v.54, p.6079–6088. 2006.

ASGHAR, A.; LIN, C.F.; CRAY, J.I.; BUCKLEY, D.J.; BOOREN, A.M.; FLEGAL, C.J. Effect of dietary oils and α -tocopherol supplementation on membranal lipid oxidation in broiler meat. **Journal Food Science**. v.55, p.46-50, 1990.

AYTUL, K.K. Antimicrobial and antioxidante activities of olive leaf extract and its food applications. **Master of Science**. Izmir. 102f. 2010.

BARBUT, S. **Poultry products processing: an industry guide**. Boca Raton: CRC, 2002. 548p.

BARRETO, M.S.R. **Uso de extratos vegetais como promotores de crescimento em frangos de corte**. 51f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2007.

BENAVENTE-GARCIA O., CASTILLO, J., LORENTE J., ORTUNO A. AND DEL RIO J.A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, v.68. p.457–462, 2000.

BENLARDI, L. MAKHLOUFI, A. TARFAYA, B. BELAHCENE, M. MOUSSAOUI, A. MAKHLOUFI, N. BENSAFI, H. BOULANOUAR, A. MEBARKI, L. Biological activities of *Olea europea sylvestris* Tar, growing wild in South West of Algeria. **International Journal Current Microbiology Applied Sciences**. v.3, n.8, p.771-777. 2014.

BERAQUET, N.J. **Carne mecanicamente separada de aves**. Campinas: ITAL, 2000. 92p.

BERGER, K.G.; HAMILTON, R.J. **Developments in Oils and fats**. London: Chapman & Hall, 1995, cap.7.

BISIGNANO, G., LAGANA, M. G., TROMBETTA, D., ARENA, S., NOSTRO, A., UCCELLA, N., In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europea* L. **FEMS Microbiology Letters**. v.198, p.9–13. 2001.

BISIGNANO, G.; TOMAINO, A.; LOCASCIO, R.; CRISAFI, G.; UCCELE, N.; SAIJA, A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. **Journal Pharmacy Pharmacology**. v.51 p.971-974. 1999.

BIZZI, C. A.; BARIN, J. S.; MÜLLER, E. I.; SCHMIDT, L.; NÓBREGA, J. A.; FLORES, E. M. M. Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid. **Talanta**, n. 83, p. 1324-1328, 2011.

Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiology**. v.37, p.911-917. 1959.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2ed., 2001, 223p.

BOCK, M., DERRAIK, J., BRENNAN, C., BIGGS, J., MORGAN, P., HODGKINSON, S., HOFMAN, P., Cutfield, W. Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. **PLoS One**. 2013.

BORBA A.K.O.T. MARQUES, A.P.O LEAL, M.C.C. RAMOS, R.S.P.S. Práticas educativas em diabetes Mellitus: revisão interativa da literatura. **Revista Gaúcha Enfermagem**. Porto Alegre, março, 2012.

BOTSOGLOU, E.; GOVARIS, A.; CHRISTAKI, E.; BOTSOGLOU, N. Effect of olive leaves and/or α -tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. **Food Chemistry**. v.121, p.17-22, 2010.

BOTSOGLOU, E., GOVARIS, A., AMBROSIADIS, I., FLETOURIS, D. Lipid and protein oxidation of α -linolenic acid-enriched pork during refrigerated storage as influenced by diet supplementation with olive leaves (*Olea Europea* L.) or α -tocopheryl acetate. **Meat Science**, v.92. p.525-532, 2012.

BRAGA, L.R.; PERES, L. Novas tendências em embalagens para alimentos: Revisão. **B. CEPPA**. Curitiba. v.28, n.1, p.69-84, 2010.

BRAHMI, F., MECHRI, B., DHIBI, M., HAMMAMI, M. Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. **Industrial Crops and Products**, v.49, p.256-264, 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria da Defesa Agropecuária, Instrução Normativa nº12, de 10 de abril de 2001. Regulamento Técnico Mercosul “Metodologias Analíticas, Ingestão diária admissível e limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal”. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 abr. 2001. Seção 1.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria da Defesa Agropecuária, Instrução Normativa nº20, de 21 de julho de 1999. Métodos Analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – sal e salmoura. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 set. 1999. Seção 1.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria da Defesa Agropecuária, Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14, Capítulo II.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária, Portaria nº451, de 19 de setembro de 1997. Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília**. DF, 22 set. 1997. Seção 1, p. 21005-21012.

BRESSAN, M.C. **Efeito dos fatores pré e pós abate sobre a qualidade da carne de peito de frango**. Campinas. 201f. Tese – faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de campinas. 1998.

BYRNE, D.V. et al. Sensory and chemical investigations on the effects of oven cooking on warmed-over flavor development in chicken meat. **Meat Science**, v.61, p.127-139, 2002.

CAMBERO, M.I.; DE LA HOZ, L.; SANZ, B.; ORDÓNEZ, J.A. Lipid and fatty acid composition of rabbit meat: part 1-Apolar fraction. **Meat Science**. v.29, p.153-166, 1991.

CAMPO, M.M.; NUTE, G.R.; HUGHES, S.I.; ENSER, M.; WOOD, J.D.; RICHARDSON, R.I. Flavour perception of oxidation in beef. **Meat Science**. v.72, n.2, p.303-311, 2006.

CANELA, M.R.; GONZÁLEZ, M.A.M. Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. **Maturitas**, v.68, n.3, p.245-250, 2011.

CAYAN, H.; ERENER, G. Effect of Olive Leaf (*Olea europaea*) Powder on Laying Hens Performance, Egg Quality and Egg Yolk Cholesterol Levels. **Asian-Australas J Anim Sci.**v.28, p.538-543, 2015.

CARDOSO, A.L.S.P., KANASHIRO, A.M., STOPPA, G.F.Z., CASTRO, A.G.M., LUCIANO, R., TESSARI, E.N.C. Eficiência de metodologias de preparo de amostra para pesquisa de salmonella e contagem de mesófilos em carcaças de frango. **Revista Científica de Medicina.** n.22, 2014.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; KANASHIRO, A. M. I. Pesquisa de *Salmonella* spp coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e produtos derivados de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**, Sao Paulo, v.67, n. 1, p. 25-30, 2000.

CARRERAS, I.F. **Influència de la suplementación de antioxidantes y de la administración de enrofloxacin en la cavidad y seguridad de la carne de ave.** Girona, Espanha, 2004, 304p. Tese Doutorado – Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries – Univeristat de Girona, 2004.

CAVALHEIRO, C.V.; ROSSO, V.D.; PAULUS, E.; CICHOSKI, A.J.; WAGNER, R.; MENEZES, C.R.; BARIN, J.S. Composição química de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) da região de Caçapava do Sul, RS. **Ciência Rural**, v.44, p.1874-1879, 2014.

CAVALHEIRO, C. **Extração de compostos fenólicos assistida por ultrassom e determinação de ácidos graxos e minerais em folhas de *Olea europaea* L.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. 2013.

CCAC - CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, *Guide to the care and use of experimental animals*, vol. I, Ottawa, 1993, 140 p.

CHAN, K. M.; DECKER, E. A. Endogenous skeletal muscle antioxidants. **Food Science and Nutrition**, v. 34, n.4, 403-426. 1994.

CHOULIARA, E.; BADEKA, A.; SAVVAIDIS, L.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of irradiation and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of chicken breast meat: Microbiological, chemical and sensory changes. **European Food Research and Technology**, v.226, p.877-888, 2008.

CHRISTAKI, E.V; BONOS, E.M; FLOROU-PANERI, P.C. Comparative evaluation of dietary oregano, anise and olive leaves in laying Japanese quails. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.13, p.97-101, 2011.

CMMEF, **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4^a ed. Washington, 2001.

COBOS, A.; DE LA HOZ, L.; CAMBERO, M.L.; ORDÓÑEZ, J.A. Revisión: Influencia de la dieta animal en los ácidos grasos de los lípidos de la carne. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**. v.34, n.1. p.35-51, 1994.

COMMISSION REGULATION - (EC) No 152/2009 of 27 **January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed**, O.J.L. 54, 26.02.2009.

COTRIM, W.S. Antioxidantes naturais e seus efeitos sobre a cor e nível oxidativo de carne bovina. **Revista ABCZ**. v.60, p.52-55, 2011.

COUTINHO, C. I. **Análise microbiológica da carne de frango crua após o processo de moagem**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em nutrição) - Faculdade Assis Gurgacz. 2007.

COUTINHO, E. F.; RIBEIRO, F. C.; CAPPELLARO, T.H. (Ed.). **Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.)**. Pelotas: Embrapa, Clima Temperado, 2009.

CRESPO, N.; ESTEVE-GARCIA. Dietary fatty acid profile modifies abdominal fat deposition in broiler chickens. **Poultry Science**. v.80, p.71-78, 2001.

DECKER, E.A.; FAUSTMAN, C.; LOPEZ-BOTE, C.J. **Antioxidants in muscle foods: nutritional Strategies to improve quality**. New York: Wiley, 2000. 499p.

EL, S., KARAKAYA, S. Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves: potential beneficial effects on human health. **Nutrition Reviews**, v.67, p.632-638. 2009.

ERENER G, OCAK N, OZTURK E, CANKAYA S, OZKANCA R. The Scientific and Technological Research Council of Turkey, Agriculture, **Forestry and Veterinary Research Group**, AFVRG-Project No: 1070820 report of final results. 2009. The effects of olive leaf extract on performance, some blood parameters and cecal microflora of broilers.

ESTÉVEZ, M. KYLLI P, PUOLANNE E, KIVIKARI R, HEINONEN M. Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. **Meat Science**, v.80, p.1290-1296, 2008.

ESTÉVEZ, M.; MORCUENDE, D.; VENTANAS, S. Determination of oxidation. In: MOLLET, L.M.L.; TOLDRÁ, F. Handbook of Processed meat and poultry analysis. Boca Raton: CRC Press: **Taylor & Francis**, 2009. P. 141-162.

ESTÉVEZ, M.; OLLILAINEN, V.; HEINONEN, M. Analysis of protein markers α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes in food proteins using liquid chromatography (LC)-electrospray ionization (ESI)-multistage tandem mass spectrometry (MS). **Journal Agriculture Food Chemistry**. v.57, p.3901-3910, 2009.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food borne pathogen. **Microbiology Review**. v.55, n.3, p. 476-511. 1991.

FEDDERN, V. Kupski, L. CIPOLATTI, E.P.; GIACOBBO, G. MENDES, G.L.; BADIALE-FURLONG E. SOUZA-SOARES, L.A. Physico-chemical composition, fractionated glycerides and fatty acid profile of chicken skin fat. **European Journal Lipid Science Technology**, v.112, p.1277-1284, 2010.

FELLOWS, P.J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Práticas**. São Paulo: Artmed; 2006.

FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LOPEZ, J.A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chemistry**. v.59, p.345-353, 1997.

FERRARI, R.A.; KOLLER, F.R. **Fracionamento de gordura de frango**. UEPG, Ponta Grossa. v.7, n.1, p.43-51. 2001.

FILGUERAS, R.S.; GATELLIER, P.; AUBRY, L.; THOMAS, A.; BAUCHART, D.; DURAND, D.; ZAMBIAZI, R.C.; SANTÉ-LHOUELIER, V. Colour, lipid and protein stability of Rhea americana meat during air-and vacuum-packaged storage: Influence of muscle on oxidative processes. **Meat Science**, Barking, v.86, p.665-673, 2010.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 424p, 2002.

FLORENTINO, E. R, LEITE, J. F., AS, S. N. Avaliação da qualidade microbiológica da carne comercializada em Campina Grande-PB. **Revista Higiene Alimentar**, v.11, n.47. 1997.

FRANCO, B.D.G.M. LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, p.93-98, 2008.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Microbiologia de los alimentos**, 4.ed. Editorial Acribia, Zaragoza, 681p.1993.

FREITAS, M. F. L. DE; MOTA, R. A.; LEÃO, A. E. D. DE S.; FIGUEIREDO, M.L.; FONTE, M.M.; VIEIRA, R.F.C. Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de carcaças de frango comercializadas em Recife. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.56 n.3 2004.

GALARZ, L.A. **Estimativa da vida útil em peito de frango em diferentes temperaturas de armazenamento**. 2008. 146f. Monografia (Bacharel em Química de Alimentos) Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

GALARZ, L.A.; FONSECA, G.G.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Crescimento microbiano em produtos à base de peito de frango. **Ciência Tecnologia Alimentos**. v.30, n.4. p.870-877.2010.

GALLI, C.; VISIOLI, F. Antioxidant and Other Activities of Phenolics in Olive/Olive Oil, Typical Components of the Mediterranean **Diet. Lipids**. 34:23-26. 1999.

GALLO NETTO, C. Pesquisa mostra ação do alho e da sálvia na carne de frango. **Jornal da Unicamp**, Campinas, 11 a 17 de maio de 2009.

GENOT, C. **Congelation y calidad de la carne**. Zaragoza: Acribia, 2000. 104p.

GERMAN, J.B. **Muscle lipids**. Journal Muscle Foods, v.1.p.339-361, 1990.

GILLER, G.; SINGLER, K. Oxidative stress and living cells. **Folia Microbiologica**, v.40, n.2, p.131-152. 1995.

GÖK, V.; BOR, Y.; Effect of olive leaf, blueberry and Zizyphus jujuba extracts on the quality and shelf life of meatball during storage. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.10, p.190-195, 2012.

GÖKMEN, M.; KARA, R.; AKKAYA, L.; TORLAK, E.; ÖNEN, A. Evaluation of antimicrobial activity in olive (*Olea europaea*) leaf extract. **American Journal of Microbiology**, v.5, p.37-40, 2014.

GOMES, P.C.; ALBINO, L.F.T.; SILVA, M.A. **Criação de frangos de corte**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1996. (Informe Técnico, 78).

GOMIDE, L.A.M.; RAMOS, E.M.; FONTES, P.R. **Tecnologia de abate e tipificação de carcaça**. MG: Editora UFV, 2009. Cap. 9, p.247-263.

GOVARIS, A.; BOTSOGLOU, E.; MOULAS, A.; BOTSOGLOU, N. Effect of dietary olive leaves and Rosemary on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast during refrigerated storage. **South African Journal of Animal Science**. v.40, p.145-155, 2010.

GRAU, A.; GUARDIOLA, F.; GRIMPA, S.; BARROETA, A.C.; CODONY, R. Oxidative Stability of dark chicken meat through frozen storage: influence of dietary fat and α -tocopherol and ascorbic acid supplementation. **Poultry Science**, v.80, p.1630-1642. 2001.

GRAY, J.I.; GOMAA, E.A.; BUCKELEY, D.J. Oxidative quality and shelf life of meats. **Meat Science**. v.43. p.11-123. 1996.

GRAY, R.; OWEN, D. ADAMS, C.A. **Accounting and Accountability: changes and challenges in corporate social and Environmental reporting**. prentice-hall, London. 1996.

GUIMARÃES, R.; BARROS, L.; DUEÑAS, M.; CALHELA, R. C.; CARVALHO, A. M.; SANTOS-BUELGA, C.; QUEIROZ, M. J. R.; FERREIRA, I. C. F. R. Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild Roman chamomile: A comparison between the herb and its preparations. **Food Chemistry**. v.136, p.718-725. 2013.

HARTMAN, L.; LAGO, B. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Pract.** v.22, p.475-477. 1973.

HAYES, J. E.; STEPANYAN, V.; ALLEN, P.; O'GRADY, M. N.; O'BRIEN, N. M.; KERRY, J. P. The effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on lipid oxidation and oxymyoglobin oxidation in bovine and porcine muscle model systems. **Meat Science**, v. 83, p. 201-208, 2009.

HALOUI, E., MARZOUK, Z., MARZOUK, B., BOUFTIRA, I., BOURAOUI, A., FENINA, N. Pharmacological activities and chemical composition of the *Olea europaea* L. leaf essential oils from Tunisia. Food, **Agriculture and Environment**. v.8, v.204-208, 2010.

HERAS, A.; SCHOCH, A.; GIBIS, M.; FISCHER, A. Comparison of methods for determining malonaldehyde in dry sausages by HPLC and the classic TBA test. **European Food Research and Technology**, New York, v.217, p.180-184, 2003.

HOLLEY, R.A. GILL, C.O. Usos de embalagem em atmosfera modificada para carnes e produtos cárneos. Palestra. **III Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes**. 27 a 29 de setembro de 2005.

HUALLANCO, M.B.A. **Aplicação de um sistema de classificação de carcaças e cortes e efeito pós abate da qualidade de cortes de frango criados no sistema alternativo**. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2004. 82f.

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microbial Ecology of Foods**. 1. Factors affecting life and death of microorganism. v.2. Food Commodities –Academic. New York/ London/ Toronto/ Sidney/ San Francisco, 1986.

IFST - Institute of Food Science and Technology. **Development and use of microbiological criteria for foods**. ISBN 0 905367. (1999).

INGHAM, S. C; SCHMIDT, D. Alternative Indicator bacteria analyses for evaluating the sanitary condition of beef carcasses. **Journal of Food Protection**. v.63, p.51-55, 2000.

INSANI, E. M.; EYHERABIDE, A.; GRIGIONI, G.; SANCHO, A. M.; PENSEL, N. A.; DESCALZO, A. M. Oxidative stability and its relationship with natural antioxidants during refrigerated retail display of beef produced in Argentina. **Meat Science**, Barking, v. 79, n. 3, p. 444-452, 2008.

JADHAV, S. J., S.S. NIMBALKAR, A.D. KULKARNI AND D.L. MADHAVI, **Lipid oxidation in biological and food systems**. In: Food Antioxidants. (Eds.): D.L. Madhavi, S.S. Deshpande and D.K. Salunkhe. Marcel Dekker, New York, p.5-63. 1996.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. Colour stability and lipid oxidation of fresh beef. Development of a response surface model for predicting the effects of temperature, storage time, and modified atmosphere composition. **Meat Science**, Oxford, UK, v.54, n.1, p.49-57, 2000.

JENSEN, C.LAURIDSEN, C; BERTELSEN, G. Dietary vitamin E: quality and storage stability of pork and poultry. **Trends Food Science Technology**. v.9, p.62-72, 1998.

JOHNSON, E.A. Infrequent microbial infections. In: CLIVER, D.O. **Foodborne diseases**. Academic Press, San Diego, 395p. Cap. 19, p.260-275. 1990.

KAREL, M. Physical principles of food preservation. Madison: CRC Press, cap.10, p.309-358: **Dehydration of foods**.1975.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1998. p. 397-9, 402, 404-6.

KIKUGAWA, K.; KATO, T.; HAYASAKA, A. Formation of dityrosine and other fluorescent amino acids by reaction of amino acids with lipid hydroperoxides. **Lipids**, v.26, p.922-929, 1991.

KOBLITZ, M.G.B. **Matérias-primas alimentícias: composição e controle de qualidade**. RJ: Guanabara Koogan, 2011, 301p.

KOMAKI, E. YAMAGUCHI, S. MARU, I. KINOSHITA, M. KAKEHI, K., OHTA, Y., TSUKADA, Y. Identification of anti- α -amylase componets from olive leaf extracts. **Food Science and Technology Research**, v.9, p.35-39. 2003.

KONTOGIANNI, V., GEROTHANASSIS, I., Phenolic compounds and antioxidante activity of olive leaf extracts. **Natural Product Research**, 26, 186-189. 2012.

KRANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. **Meat Science**, Kidlington, v.36, p.169-189, 1994.

LABUZA, T.P **Shelf-life**. Dating of Foods, Westport. CT. Food & Nutrition Press, 1982.

LAFKA, T.I.; LAZOU, A.E.; SINANOGLU, V.J.; LAZOS, E.S. Phenolic extracts from wild olive leaves and potential as edible oils antioxidants. **FOODS**. v.2, p.18-31, 2013.

LANARA. **Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. II – Métodos físico químicos**. Brasília, Ministério da Agricultura, 1981.

LE BIHAN-DUVAL, E. MILLET, N. & REMIGNON H. Broiler meat quality: effect of selection for increased carcass quality and estimates of genetic parameters. **Poultry Science**, Savoy, v. 78, p. 822-826, 1999.

LEE, O.H., B.Y. LEE. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined Phenolics in *Olea europea* leaf extract. **Bio Tech.**, 101: 3751-3754. 2010.

LEE, O.H., LEE, B.Y., LEE, J., LEE, H.B., SON, J.Y., PARK, C.S., SHETTY, K., KIM, Y.C. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. **Bio resource Technology**. v.100, p.6107-6113. 2009.

LEE-HUANG, S., ZHANG, L., HUANG, P., CHANG, Y., HUANG P. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression. By HIV-1 infection and OLE treatment. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.307, p.1029-1037, 2003.

LEVINE R. L., GARLAND D., OLIVER C. N., AMICI A., CLIMENT I., LENZ A. G., AHN B. W., SHALTIEL S., STADTMAN E. R. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**. v.186, p.464-478. 1990.

LIMA, E.S; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.37, n.3, 2001.

LIMA, R.S.N. **Caminhando pela bioquímica**. 1º ed. Fortaleza 2003, p.138-143.

LÓPEZ-FERRER, S., M. D. BAUCCELLS, A. C. BARROETA, AND M. A.GRASHORN. N-3 enrichment of chicken meat using fish oil: Alternative substitution with rapeseed and linseed oils. **Poultry Science**. v.78, p.356–365. 1999.

LORRAIN-SMITH, J. The pathological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. **Journal Physiology**. v.24, p.19-25. 1899.

LOWRY, O.H; ROSEBROUGH, N.J; FARR A.L, RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biol. Chem**. v.193,p.265-275. 1951.

LUND, M.N. Protein oxidation in muscle foods: A review. **Mol. Nutr. Food Res**, v.55, p.83-95, 2011.

LUND, M.N.; LAMETSCH, R.; HVIID, M.S.; JENSEN, O.N.; SKIBSTED, L.H. High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage. **Meat Science**, Barking, v.77, p.295-303, 2007.

MANCINI, R.A.; HUNT, M.C.; Current research in meat color. **Meat Science**. v.71, n.1, p.100-121, 2005.

MARASCHIELLO, C., SARRAGA, C., GARCIA-REGUEIRO, J. A. Glutathione peroxidase activity, TBARs, and α -tocopherol in meat from chicken fed different diets. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v.47, p.867-872. 1999.

MARKIN, D.; DUEK, L.; BERDICEVSKY I. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. **Mycoses**. v.46, p.132-136. 2003.

MAROSO, M. T. D. **Efeito da redução de temperatura de carcaças de frango na multiplicação de microrganismos**. Dissertação de Mestrado – UFRGS, Porto Alegre/RS, 2008.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 94, 99, 100, 106, 212-13, 294. 1999.

MEIRINHOS, JULIETA; SILVA, B.M.; VALENTÃO, P.; SEABRA, R.M.; PEREIRA, J.A.; DIAS, A.; ANDRADE, P.B.; FERRERES, F. - Analysis and quantification of flavonoidic compounds from Portuguese olive (*Olea europaea* L.) leaf cultivars. **Natural Product Research**. 19:2, p. 189-195, 2005.

MENDES, A.A.; MOREIRA, J.; GARCIA, R.G. Qualidade da carne de peito de frango de corte. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, v.27, n.317, p.138-144, 2003.

MELLO, L.D.; PINHEIRO, M.F. Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v.23, p.537-548, 2012. Acesso em: 13 ago. 2013.

MELLOR, G. E.; BENTLEY, J. A.; DYKES, G. A. Evidence for a role of biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* in the spoilage of fresh aerobically stored chicken meat. **Food Microbiology**. v.28, p.1101-1104. 2011.

MELO, D. S.; CORRÊA, A.D.; MARCOS, F.C.A.; SOUZA, R.V.; ABREU, C.M.P.; SANTOS, C.D. Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a peroxidação lipídica, o perfil

lipídico sanguíneo e o peso do fígado de ratos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p.420-428, 2007.

MICOL, V., CATURLA, N., PÉREZ-FONS, L., MÁ, V., PÉREZ, L. ESTEPA, A., 2005. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). **Antiviral Research**, v.66, p.129-136. 2005

MIYAGUSKU, L.; CHEN, F.; LEITÃO, M.F.DE F.; BAFFA, O. Microbiological and sensory evaluation of the shelf-life of irradiated chicken breast meat. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.23, p.7-16, 2003.

MORGAN, C.A.; NOBLE, R.C.; COCCHI, M.; MCCARTNEY, R. Manipulation of the fatty acid composition of pig meat lipids by dietary means. **Journal Science Food Agriculture**, v.58, p.357-368, 1992.

MORRISEY, E. E., TANG, Z., SIGRIST, K., LU, M. M., JIANG, F., IP, H. S. AND PARMACEK, M. S. GATA-6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. **Genes Dev**. v.12, n.22, p.3579-3590. 1998.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica: princípios e interpretações**. 4ª. ed., Editora: Médica Massau, 2003, 419 p.

MURIANA, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **Journal Food Protection**, v.59, p.54-63. 1996.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: a review. **Analytica Chimica Acta**, v.703, p.8-18, 2011.
NAWAR, W.W. Lipids. In: Fennema, O.R. (Ed.) **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker. p.139-244. 1985.

NEU, H.C. The crisis in antibiotic resistance. **Science**, v.257, p.1064-1073. 1992.

O'GRADY.M.N.; MONAHAN, F.J.; BURKE, R.M.; ALLEN, P. The effect of oxygen level on the oxidative stability of intact and minced beef steaks in MAP packs. **Journal Agriculture Food Research**. v.36, p.284. 1997.

ORDÓNEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos**. Porto Alegre: Artmed; 2005.

OWEN, R.W., R. HAUBNER, W. MIER, A. GIACOSA; W.E. HULL. **Food Chem. Toxicol.**, v.41, p.703-717. 2003.

OLIVO, R. **Estrutura, composição e funcionalidade do tecido muscular**. In: Olivo, Oo MUNDO DO FRANGO. Criciúma: Do autor, 2006. P. 239-272. 2006.

PACETTA, C.F. **Estudo de diferentes metodologias para obtenção de extratos de folhas de oliveira (*Olea europaea*) contendo oleuropeína**. Pirassununga. 82f. 2013.

PACETTA, C.F. **Oliveira, a árvore da vida: estudo avançado sobre as folhas da oliveira na modulação da saúde: o antibiótico da mãe natureza**. Mogi Guaçu, SP: ED. do Autor, 2007.

PAINE, F.A.; PAINE, H.Y. **A handbook of food packing**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1983, 497p.

PAIVA-MARTINS, F.; BARBOSA, S.; PINHEIRO, V.; MOURÃO, J.L.; OUTOR-MONTEIRO, D. The effect of olive leaves supplementation on the feed digestibility, growth performances of pigs and quality of pork meat. **Meat Sciences**, in Press. 2009.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDE, H.S. **Ciência e tecnologia da carne**. 2° Ed. V.1. Goiânia, 2005, 624p.

PEARSON, A.M.; GRAY, J.I. **The Maillard Reaction in Foods and Nutrition**. Symposium Series 215, American Chemical. Society, Washington, D.C. p.287-302. 1983

PEREIRA, A.P.; FERREIRA, I.C.F.R.; MARCELINO, F.; VALENTAO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.; ESTEVINHO, L.; BENTO, A.; PEREIRA, J.A. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Corbançosa) Leaves. **Molecules**, v.12, p.1153-1162, 2007.

PEREIRA, K.S.; PEREIRA, J.L. Estafilococos coagulase negativa: potenciais patógenos em alimentos. **Higiene Alimentar**. v. 19, p.32-34. 2005.

PINO, L.M. **Estabilidade oxidativa da carne de frangos alimentados com diferentes fontes lipídicas, armazenada sob congelamento**. São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005. 72f.

PORTO, E. **Qualidade da carne: microbiologia de carnes** Ed: Varela São Paulo-SP 2006 p.101-131.

QUIRANTES-PINÉ, R.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; HERRERO, M.; IBÁÑEZ, E.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. HPLC-ESI-QTOF-MS as a powerful analytical tool for characterising phenolic compounds in olive-leaf extracts. **Phytochemical analysis**. v.24, p.213-223, 2013.

RABABAH, T., HETTIARACHCHY, N., HORAX, R., ESWARANANDAM, S., MAUROMOUSTAKOS, A., DICKSON, J., & NIEBUHR, S. Effect of electron beam irradiation and storage at 5 °C on thiobarbituric acid reactive substances and carbonyl contents in chicken breast meat infused with antioxidants and selected plant extracts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, n.26, p.8236-8241. 2004.

RAHARJO, S.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Improved Speed, Specificity, and Limit of Determination of an Aqueous Acid Extraction Thiobarbituric Acid-C₁₈ Method for Measuring Lipid Peroxidation in Beef. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v.40, n.11, p.2182-2185, 1992.

RACANICCI, A.M.C. **O efeito do uso do óleo de vísceras de aves oxidado no desempenho de frangos de corte e na estabilidade oxidativa da carne da sobrecoxa**. Piracicaba. 80p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2004.

RAHMAN, M.S. RUIZ, J.F.V. **Food preservation by freezing**. In: RAHMAN, M.S. Handbook of Food Preservation. Boca Raton: CRC Press, p. 635-657. 2007.

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

RANALLI A.; CONTENTO S.; LUCERA L.; DI FEBBO M. DI; MARCHEGIANI D.; FONZO V. D. Factors Affecting the Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea* L.) **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 54, p. 434-440. 2006.

RECKNAGEL, R. O.; GLENDE JR., E. A. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. **Methods Enzymol**. v.105, p.331-337. 1984.

REEVES, P.G. NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation. **The Journal of Nutrition**, v.123, p.1939-51, 1993.

RHEE, K.S.; ZIPRIN, Y.A.; ORDONEZ, G.; BOHAC, C. E. Fatty acid profiles and lipid oxidation in pork muscles as affected by canola oil in the animal diet and muscle location. **Meat Science**, v.23, p.201-210, 1992.

RITTER, R.; BERGMANN, G. P. Eficácia do sistema de pré-resfriamento de frangos em tanques, sobre a redução da contaminação bacteriana de carcaças. **Higiene alimentar**. v.17, n. 108, p.97-104, 2003.

ROBERTSON, G.L. **Food packaging: principles and practice**. New York: Marcel Decker, 1992. 676p.

ROÇA, R.O. **Composição química da carne**. UNESP, Campus de Botucatu, 12p.1999.

ROMERO, F.J., BOSCH-MORELL, F., ROMERO, M.J. ROMERO, B. MARIN, N., ROMA, J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. **Environmental Health Perspectives**, v.106, p.1229-1234, 1998.

ROQUE-SPECHT, V.F. SIMONI, V., PARISE, N., CARDOSO, P.G. Evaluation of water retention capacity in chicken breasts due to final pH. **Revista Brasileira Agrociência**, v.15, n.1-4, p.77-81, 2009.

ROWE, L.J.; MADDOCK, K.R.; LONERGAN, S.M.; HUFF-LONERGAN, E. Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. **Journal of Animal Science**, Albany, V.82, P.785-793, 2004.

RUIZ-BARBA, J. L., GARRIDO-FERNADEZ, A., & JIMENEZ-DIAZ, R. Bactericidal action of oleuropein extracted from green olives against *Lactobacillus plantarum*. **Letters in Applied Microbiology**, v.12, p.65-68, 1991.

RUIZ-BARBA, J. L., RIO-SANCHEZ, R. M., FEDRIANI-TRISO, C., OLIAS, J. M., RIOS, J. L., & JIMENEZ-DIAZ, R. Bactericidal effect of phenolic compounds from green olive against *L. plantarum*. **Systematic Applied Microbiology**, v.13, p.199-205, 1990.

RYAN, D., ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P., ROBARDS, K., LAVEE, S. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. **Scientia Horticulturae**, v.92 p.147-176, 2002.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. **New York: University of Wisconsin**, 1991, 632 p.

SANTÉ-LHOUTELLIER, V., ASTRUC, T., MARINOVA, P., GRÉVE, E., GATELLIER, P., 2008. Effect of meat cooking on physicochemical state and in vitro digestibility of myofibrillar proteins. **Journal Agriculture Food Chemistry**, 56 (5), 1488-1494.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; OLIVEIRA, L.M.; CANAVESI, E. **Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis**. Campinas: CETEA/ITAL, 2001. 213p.

SATO H., GENET C., STREHLE A., THOMAS C. LOBSTEIN A. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 362, p. 793-8, 2007.

SMEWW, **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20. ed. / 1998 - AWWA / APHA / WEF e ABNT.

SELANI, M.M. **Extrato de bagaço de uva como antioxidante natural em carne de frango processado e armazenado sob congelamento**. Piracicaba. .101p. 2010.

SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metabolism Reviews**. v.32. p.307-326, 2000.

SIGER, A., CZUBINSKI, J., KACHLICKI, P., DWIECKI, K., LAMPART-SZCZAPA, E., NOGALA-KALUCKA, M., Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.25, p.190-197, 2012.

SILVA Jr, E. A. da. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. 6ª ed, São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**. v.22. 1999.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A; SILVEIRA, N. F. A. TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Varela, 2007.

SINGH, I., MOK, M., CHRISTENSEN, A., TURNER, A., HAWLEY, J. The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. **Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.18, p127-132, 2008.

SOLER-RIVAS, C.; EPSIN, J.C.; WICHERS, H.J. Oleuropein and related compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1013-1023. 2000.

SOMOVA, L., SHODE, F., RAMNANAN, P., NADAR, A. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidante activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.84, p.299-305, 2003.

SOUZA, M.C.; TEIXEIRA, L.J.Q.; ROCHA, C.T.; FERREIRA, G.A.M.; FILHO, T.L. Emprego do frio na conservação de alimentos. **Enciclopédia Biosfera**. v.9.p.1027-1046. 2013.

SOYER, A., ÖZAP, B., DALMIS, Ü.,BILGIN, V. Effects of freezing temperature and duration of frozen storage on lipid and protein oxidation in chicken meat. **Food Chemistry**. v.120, p.1025-1030. 2010.

SPITELLER, P.; SPITELLER, G. Strong dependence of lipid peroxidation product spectrum whether Fe²⁺/O₂ or Fe³⁺/O₂ is used as oxidant. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v.1392. n.1. p.23-40, 1998.

STADTMAN, E.R. Protein oxidation and aging. **Science**. v.257, 1992.

STANDARD METHODS. (ISO 13720-1:2010). 2010.

STONE, H.; SIDEL, J.L. Sensory evaluation practices. Orlando: Academic Press, 1985. **Food science and technology**. 287p.

SUDJANA, A.N., D'ORAZIO, C., RYAN, V., RASOOL, N., NG, J., ISLAM, N., RILEY, T.V., HAMMER, K.A. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.33, p.461-463. 2009.

SUN, Q., SENEAL, A., CHINACHOTI, P., FAUSTMAN, C. Effects of water activity on lipid oxidation and protein solubility in freeze-dried beef during storage, **Journal Food Science**, v.67 n.6. 2002.

SURAI, P. F.; DVORSKA, J. E. Strategies to enhance antioxidant protection and implications for the well-being of companion animals. In: Biotechnology in the feed and food industries,

Proceedings of all tech's, 18 annual symposium, Nottingham 49 **Anais Nottingham University Press**, UK. p.521-534, 2002.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. I—quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal Science Food Agricultural**, v.19, p.63-68, 1959.

TAAMALLI, A. **Characterization of polyphenols in Tunisian olive with anticancer capacity using liquid chromatography coupled to mass spectrometry**. Faculty of sciences: University of Granada. 312p. 2012.

TBCA/USP, Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental/Brasil Foods (1998). **Tabela Brasileira de composição de Alimentos**, versão 5.0. Disponível em <http://www.fcf.usp.br/tabela>. Acesso em 20.04.2013.

TAN, F., CHEN, R., 2005. **Quality characteristics of Chinese-style sausage made different raw materials and stored under refrigeration**, Proc., 51-st ICoMST, Baltimore, Maryland, USA, 7-12 August 2005, Section 4, F.29, p.139.

TOGASHI, C.K., FONSECA, J.B., SOARES, R.T.R.N., GASPAR, A. DETMANN, E. Composição em ácidos graxos dos tecidos de frangos de corte alimentados com subprodutos de maracujá. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.36, p.2063-2068, 2007.

TONETTI, C.R.; NICOLETTI, J.F.; STRÖHER, G.L. **Determinação físico-química da carne de frango**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. 6p. 2011.

TORRES, E.A.F.S.; CAMPOS, N.C.; DUARTE, M.; GARBELOTTI, M.L.; PHILIPPI, S.T.; MINAZZI-RODRIGUES, R.S. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p.145-150, 2000.

TRABELSI K, EL ABED K, TREPANOWSKI JF. Effects of ramadan fasting on biochemical and anthropometric parameters in physically active men. **Asian J Sports Med.**, v.2, p.134-144, 2011.

TUCK, K.L., HAYBALL, P.J., 2002. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. **Journal Nutritional Biochemistry**, v.13, p.636–644.

UBABEF. **União Brasileira de Avicultura**. Relatório Anual 2010/2011. Disponível em: <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em: 06 de jan.2012.

UPADHYAY, R.K. Evaluation of antibacterial and antifungal activities of olive (*Olea europaea*) essential oil. **International Journal of Green Pharmacy**, v.8, p.180-186, 2014.

VALSTA, L.M.; TAPANAINEN, H.; MANNISTO, S. Meat fats in nutrition. **Meat Science**. Oxford. V.70, p.525-530, 2005.

VAN LAACK, R.L.J.M. Spoilage and preservation of muscle foods. In: Kinsman, D. M.; Kotula, A.W.; Breidenstein, B.C. **Muscle Foods**. New York: Chapman and Hall, 1994. Cap. 14, p.378-405.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. **Características da Carne de Frango**. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. Boletim Técnico - PIE-UFES: 01307 - Editado: 18.08.2007, 7p.

VERMA, S.P.; SAHOO, J. Improvement in the quality of ground chevon during refrigerated storage by tocoferol acetate preblending. **Meat Science**, v.56, p.403-413, 2000.

VIEIRA, E.T.T. **A influencia do processo de congelamento na qualidade do peito de frango**. URI: Campus Erechim. 119f, 2007.

XIONG, Y.L.; MULLINS, O.E.; STIKA, J.F.; CHEN, J.; BLANCHARD, S.P.; MOODY, W.G. Tenderness and oxidative stability of post-mortem muscles from mature cows of various ages. **Meat Science**, v.77, p.105-113, 2007.

WELTI, J.; VERDGARA, F. **Atividade de água / Conceito y aplicación em alimentos com alto contenido de humedad**. In: AGUILERA, J.M. Temas em Tecnologia de Alimentos. Santiago – Chile, v.1, p.11-26, 1997.

ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; BATTAGLIA, A.; CHIZZOLINI, R. Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on diferente processing conditions and diferente antioxidants. **Meat Science**, Oxford, v.66, n.2, p.415-423, 2004.

WANG, B., PACE, R.D., DESSAI, A.P., BOVELL-BENJAMIN, A., & PHILLIPS, B. Modified Extraction Method for Determining 2-Thiobarbituric Acid Values in Meat with Increased Specificity and Simplicity. **Journal of food Science**. v. 67, p.2833-2836. 2002.