

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

**APLICAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS
EM CARNE MECANICAMENTE
SEPARADA (CMS) DE AVE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marlene Gomes Pereira

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**APLICAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS
EM CARNE MECANICAMENTE
SEPARADA (CMS) DE AVE**

por

Marlene Gomes Pereira

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

Orientador: Prof. Nelcindo Nascimento Terra

Santa Maria, RS, Brasil

2009

P436a Pereira, Marlene Gomes

Aplicação de antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de ave / por Marlene Gomes Pereira ; orientador Nelcindo Nascimento Terra. - Santa Maria, 2009.
126 f.; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2009.

1. Tecnologia de alimentos 2. Carne mecanicamente separada 3. Oxidação 4. Antioxidante natural 5. Antioxidante sintético 6. BHA 7. TBARS 8. Shelf life 9. Microrganismo 10. Cor da carne I. Terra, Nelcindo Nascimento II. Título

CDU: 637.54'65

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

© 2009

Permitida a cópia total ou parcial deste documento sem prévia autorização, desde que citada a fonte. - O autor.

Endereço: Rua Herculano Hércules Zanuzzo, nº 109, apto. 102, Bairro Industrial, Seara - SC 89770-000 .

Fone/Fax: (0xx) 49 3452-4095 End. Eletr: marlenen@netcon.com.br

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

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

**APLICAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS
EM CARNE MECANICAMENTE
SEPARADA (CMS) DE AVE**

elaborada por
Marlene Gomes Pereira

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Nelcindo Nascimento Terra, Dr.
(Presidente/Orientador)

Alexandre José Cichoski, Dr. (URI-Erechim)

Neila Silvia Pereira dos Santos Richards, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 30 de abril de 2009.

Dedico esse trabalho ao meu maior
alicerce terreno: Anderson Alessi.
“...quando estou contigo estou em paz...”

AGRADECIMENTOS

Ao meu amor, Anderson Alessi, por toda a ajuda, apoio e incentivo, irrestritos e incondicionais, durante todos os momentos.

Ao Professor Nelcindo Nascimento Terra, exemplo de profissional, docente, pesquisador e pessoa, agradeço pela orientação, por dividir seus conhecimentos, pela confiança e amizade.

Ao meu amigo Anildo Cunha Júnior, Analista da Embrapa Suínos e Aves – Concórdia, por todo o suporte nas análises dos extratos. Serei eternamente grata as suas preciosas orientações, ajuda, atenção, envolvimento e pela sua dedicação no tratamento estatístico de todo o projeto. Muito obrigado.

Ao Departamento de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da UFSM, pela oportunidade de seqüenciar minha formação acadêmica.

Ao meu co-orientador Professor Ernesto Hashime Kubota e a Professora Leadir Lucy Martins Fries, pelo exemplo de profissionalismo a ser seguido.

A minha querida Professora Neila Richards, minha admiração pela sua impecável postura profissional, pelo habitual apoio e também pelas amostras de própolis.

Ao Professor Alexandre José Cichoski, pelas preciosas correções feitas nesse projeto.

Ao Engenheiro Clever Pirola Ávila, sou grata pelo apoio nos momentos decisivos.

Ao Engenheiro Paulo Donizete Guarnieri, por possibilitar que a aplicação e análises na CMS pudessem ser feitas.

Ao Wagner (UnC Concórdia) e a Liana I. Guidolin Milani, pelo auxílio nas concentrações dos extratos.

A minha amiga Luciana de Abreu, pela doação da erva mate, pelo companheirismo ao longo de todo o curso e apoio nas horas fáceis e difíceis.

Ao Jean Brustolin, pelo companheirismo demonstrado ao longo do curso.

A minha querida amiga Michele Moro, pelos “pousos”, pela amizade, pelo “querer bem”, pelo carinho e apoio. Marcell, Ângela, Andressa, vocês fizeram essa jornada ser mais agradável.

As minhas queridas Rubia Mores e Marina de Pra, por toda a ajuda e companhia durante meu período de estágio na Embrapa Suínos e Aves – Concórdia.

A Deus, meu guia.

“Águias não caçam moscas.”

Ditado Latino

RESUMO

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

APLICAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS EM CARNE MECANICAMENTE SEPARADA (CMS) DE AVE

AUTORA: MARLENE GOMES PEREIRA

ORIENTADOR: NELCINDO NASCIMENTO TERRA

CO-ORIENTADOR: ERNESTO HASHIME KUBOTA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de abril de 2009.

Este trabalho teve como objetivo avaliar cinco extratos naturais em relação a sua atividade antioxidante *in vitro* e na Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango. Foram estudadas a erva mate (*Ilex paraguariensis*), a marcela (*Achyrocline satureioides*), uma mistura de erva mate (50%) com marcela (50%), o chá verde (*Camellia sinensis*) e o própolis sem álcool. O antioxidante sintético BHA foi utilizado como controle positivo e o tratamento sem adição de antioxidante como controle negativo. Nos extratos naturais foram identificados o conteúdo total de fenólicos, flavonóides e a atividade antioxidante pelos métodos do DPPH, Fosfomolibdênio e do Poder de Redução. Todos os extratos foram aplicados separadamente em porções distintas e iguais de Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango, sendo os percentuais de aplicação de 0,50% de erva mate, marcela e da mistura, 0,05% de chá verde, 0,10% do própolis sem álcool e 0,02% de BHA. A CMS de frango foi mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias. As amostras foram avaliadas a cada dois dias, em relação ao pH, índice de TBARS, índice de peróxido, em relação a contagem média de Aeróbios Mesófilos Totais, Coliformes Totais, *E. coli*, Bactérias lácticas, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp e *Staphylococcus aureus*. A cor objetiva (L^* , a^* , b^*) foi medida na superfície e na parte interna da CMS de frango assim como o registro em foto de cada tratamento. O extrato de chá verde apresentou o maior ($p<0,05$) conteúdo de fenólicos e a maior ($p<0,05$) atividade antioxidante *in vitro* em relação aos demais extratos. O extrato de erva mate apresentou o maior ($p<0,05$) conteúdo de flavonóides. O extrato de própolis sem álcool apresentou os menores ($p<0,05$) conteúdos de fenólicos, de flavonóides e a menor atividade antioxidante *in vitro*. O extrato de marcela teve o melhor efeito na inibição da oxidação lipídica da CMS de frango, apresentando os menores valores médios de TBARS. O extrato de própolis sem álcool manteve por mais tempo a estabilidade da cor da carne. A adição dos antioxidantes naturais não interferiu no pH e nem no índice de peróxido da CMS de frango. Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp e os resultados de *Staphylococcus aureus* ficaram dentro dos padrões estabelecidos pela Legislação. O tratamento com a mistura de extratos de erva mate e de marcela apresentou a menor ($p<0,05$) contagem média de Aeróbios Mesófilos Totais em relação aos demais tratamentos. O extrato de própolis sem álcool apresentou a menor contagem média de Coliformes totais, *E. coli* e *Clostridium perfringens*. O extrato de erva mate apresentou a menor contagem média de Bactérias lácticas. O uso de antioxidantes naturais pode trazer benefícios em relação a inibição da população microbiana da CMS de frango. Mais estudos são necessários visando um melhor entendimento dos mecanismos de ação desses extratos na carne mecanicamente separada (CMS) de frango.

Palavras-chave: carne mecanicamente separada (CMS); oxidação; antioxidante natural; antioxidante sintético; BHA; TBARS; shelf life; microrganismo; cor da carne.

ABSTRACT

Master Science Degree Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

NATURAL ANTIOXIDANTS APPLICATION IN MECHANICALLY DEBONED POULTRY MEAT (MDPM)

AUTHOR: MARLENE GOMES PEREIRA

ADVISER: NELCINDO NASCIMENTO TERRA

CO-ORIENTADOR: ERNESTO HASHIME KUBOTA

Place and Date of Defense: Santa Maria, april 30th, 2009.

The purpose of this project was to evaluate the antioxidant activity *in vitro* and its effects at the oxidative stability of mechanically deboned poultry meat (MDPM) of five natural extracts. It was studied: the yerba mate (*Ilex paraguariensis*), the “marcela” (*Achyrocline satureioides*), a mixture of yerba mate (50%) and “marcela” (50%), green tea (*Camellia sinensis*) and propolis without alcohol. The synthetic antioxidant BHA (Butylated Hydroxyanisole) was used as a positive control and the meat treated with no antioxidant was used as negative control. Natural extracts were evaluated *in vitro* for quantification of phenolic and flavonols total content, for antioxidant activity, by DPPH radical-scavenging, Phosphomolybdenum complex and Reducing Power assay methods. All antioxidants were mixed separately in different and equal portions of mechanically deboned poultry meat, as follow: 0.50% of yerba mate, “marcela” and the mixture, 0.05% of green tea, 0.10% of própolis without alcohol and 0.02% of BHA. Samples of MDPM were packed and storage at 0 to +4°C for 10 days. The samples were evaluated each two days and the pH, TBARS and peroxide index were measured, as well as the Total Mesophilic Aerobic counts, Total Coliforms, *E. coli*, Lactic Bacteria, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp and *Staphylococcus aureus*. Surface and internal colour (L^* , a^* , b^*) were measured and pictures of each treatment were done. Green tea extract showed the higher ($p<0.05$) phenolics contents and the higher ($p<0.05$) antioxidant activity *in vitro* compared to the other extracts. Yerba mate extract showed the higher ($p<0.05$) flavonols content. Propolis without alcohol extract showed the lowest ($p<0.05$) phenolics, flavonols and antioxidant activity *in vitro*. “Marcela” had the best oxidative inhibitory effect at the MDPM, with the lowest TBARS values. Propolis extract showed the best performance for the meat colour stability. Natural antioxidant addition do not interfere at MDPM pH and peroxide values. *Salmonella* spp was not detected in any of the samples evaluated and the results found to *Staphylococcus aureus* were in agreement with the Brazilian Mechanically Deboned Meat Legislation. The mixture of extracts showed the lowest ($p<0.05$) media for Total Mesophilic Aerobic counts. Propolis extract showed the lowest media count for Total Coliforms, *E. coli* and *Clostridium perfringens*. Yerba mate extract showed the lowest media count for Lactic Bacteria. The use of natural antioxidants should provide benefits in relation to the MDPM lipid oxidation and the microbiological growth inhibition. More researchs are necessary, looking for a better understanding about the action mechanisms of these extracts.

Keywords: mechanically deboned chicken meat (MDCM); oxidation; natural antioxidant; synthetic antioxidant; BHA; TBARS; shelf life; microorganism; meat colour.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01- Fluxograma genérico de um abate de aves.....	23
FIGURA 02 - Máquina de separação mecânica de carne.....	27
FIGURA 03 - Máquina de separação mecânica de carne.....	27
FIGURA 04 - Produção de Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Ave em escala industrial.....	27
FIGURA 05 - Esquema da oxidação da mioglobina.....	35
FIGURA 06 - Diagrama de Hunter mostrando as variáveis L^* , a^* , b^*	36
FIGURA 07 - Reação do teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido, medido espectrofotometricamente.....	37
FIGURA 08 - Mecanismo geral da autooxidação lipídica.....	40
FIGURA 09 - Mecanismo de ação dos antioxidantes primários.....	42
FIGURA 10 - Estrutura do BHA.....	43
FIGURA 11 - Matéria prima utilizada para a extração da CMS: dorso de frango sem anca+porção frontal/peitoral+pescoço sem pele).....	61
FIGURA 12 - Fotos da superfície da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Frango, pertencentes aos tratamentos controle negativo (sem antioxidante), controle positivo (BHA), com extrato de chá verde e com extrato de própolis sem álcool nos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10 de estocagem sob refrigeração de 0 a +4°C.....	92
FIGURA 13 - Fotos da superfície da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Frango, pertencentes aos tratamentos controle negativo (sem antioxidante), controle positivo (BHA), com extrato de erva mate, com extrato de marcela e com a mistura dos extratos de erva mate e marcela nos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10 de estocagem sob refrigeração de 0 a +4°C.....	93
FIGURA 14 - Fotos da parte interna da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Frango, pertencentes aos tratamentos controle negativo (sem antioxidante), controle positivo (BHA), com extrato de chá verde e com extrato de própolis sem álcool nos dias 2, 4, 6, 8 e 10 de estocagem sob refrigeração de 0 a +4°C.....	94
FIGURA 15 - Fotos da parte interna da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Frango, pertencentes aos tratamentos controle negativo (sem antioxidante), controle positivo (BHA), com extrato de erva mate, com extrato de marcela e com a mistura dos extratos de erva mate e marcela nos dias 2, 4, 6, 8 e 10 de estocagem sob refrigeração de 0 a +4°C.....	95

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01 : Resultados do conteúdo de Fenólicos Totais (mg eq. ácido gálico/g extrato) dos extratos de erva mate, marcela, da mistura dos extratos de erva mate e marcela, do extrato de chá verde e do extrato de própolis sem álcool.....	71
GRÁFICO 02 : Resultados do conteúdo de Flavonóides (mg eq. (+)-catequina/g extrato) dos extratos de erva mate, marcela, da mistura dos extratos de erva mate e marcela, do extrato de chá verde e do extrato de própolis sem álcool.....	71
GRÁFICO 03 : Atividade Antioxidante dos padrões ácido gálico, (+)-catequina e BHA pelo método de Capacidade de seqüestro do radical DPPH.....	74
GRÁFICO 04: Atividade Antioxidante dos extratos de erva mate, marcela, da mistura dos extratos de erva mate e marcela, do extrato de chá verde e do extrato de própolis sem álcool pelo método de Capacidade de seqüestro do radical DPPH.....	75
GRÁFICO 05 : Atividade Antioxidante dos padrões ácido gálico, (+)-catequina e BHA pelo método do Poder de redução.....	76
GRÁFICO 06: Atividade Antioxidante dos extratos de erva mate, marcela, da mistura dos extratos de erva mate e marcela, do extrato de chá verde e do extrato de própolis sem álcool pelo método do Poder de redução.....	76
GRÁFICO 07: Capacidade Antioxidante Total (μmol ácido gálico/g extrato) dos extratos de erva mate, marcela, da mistura dos extratos de erva mate e marcela, do extrato de chá verde e do extrato de própolis sem álcool pelo método do Fosfomolibdênio.....	77
GRÁFICO 08: Valores médios de pH da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango sem adição de antioxidantes (controle negativo) e adicionada de extrato de erva mate (0,50%), extrato de marcela (0,50%), da mistura dos extratos de erva mate e marcela (0,50%), do extrato de própolis sem álcool (0,10%), do extrato de chá verde (0,05%) e do antioxidante sintético BHA (0,02%), mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.....	78
GRÁFICO 9: Valores médios de TBARS (mg MA/kg) da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango sem adição de antioxidantes (controle negativo) e adicionada de extrato de erva mate (0,50%), extrato de marcela (0,50%), da mistura dos extratos de erva mate e marcela (0,50%), do extrato de própolis sem álcool (0,10%), do extrato de chá verde (0,05%) e do antioxidante sintético BHA (0,02%), mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.....	84

GRÁFICO 10: Contagem média de microrganismos Aeróbios Mesófilos Totais (Log_{10} UFC/g) em Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango sem adição de antioxidantes (controle negativo) e adicionada de extrato de erva mate (0,50%), extrato de marcela (0,50%), da mistura dos extratos de erva mate e marcela (0,50%), do extrato de própolis sem álcool (0,10%), do extrato de chá verde (0,05%) e do antioxidante sintético BHA (0,02%), mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.....	97
GRÁFICO 11: Contagem média de microrganismos Coliformes Totais (Log_{10} UFC/g) em Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango sem adição de antioxidantes (controle negativo) e adicionada de extrato de erva mate (0,50%), extrato de marcela (0,50%), da mistura dos extratos de erva mate e marcela (0,50%), do extrato de própolis sem álcool (0,10%), do extrato de chá verde (0,05%) e do antioxidante sintético BHA (0,02%), mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.....	98
GRÁFICO 12: Contagem média de microrganismos <i>E. coli</i> (Log_{10} UFC/g) em Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango sem adição de antioxidantes (controle negativo) e adicionada de extrato de erva mate (0,50%), extrato de marcela (0,50%), da mistura dos extratos de erva mate e marcela (0,50%), do extrato de própolis sem álcool (0,10%), do extrato de chá verde (0,05%) e do antioxidante sintético BHA (0,02%), mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.....	100
GRÁFICO 13: Contagem média de microrganismos Bactérias lácticas (Log_{10} UFC/g) em Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango sem adição de antioxidantes (controle negativo) e adicionada de extrato de erva mate (0,50%), extrato de marcela (0,50%), da mistura dos extratos de erva mate e marcela (0,50%), do extrato de própolis sem álcool (0,10%), do extrato de chá verde (0,05%) e do antioxidante sintético BHA (0,02%), mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.....	102
GRÁFICO 14: Contagem média de microrganismos <i>Clostridium perfringens</i> (Log_{10} UFC/g) em Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango sem adição de antioxidantes (controle negativo) e adicionada de extrato de erva mate (0,50%), extrato de marcela (0,50%), da mistura dos extratos de erva mate e marcela (0,50%), do extrato de própolis sem álcool (0,10%), do extrato de chá verde (0,05%) e do antioxidante sintético BHA (0,02%), mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.....	103

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01- Características físico-químicas da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Ave.....	25
QUADRO 02 - Características microbiológicas da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Ave.....	26

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Volumes em tonelada de carne brasileira exportados em 2007.....	21
TABELA 02 - Volumes em tonelada de carne de frango por produto exportado em 2007	22
TABELA 03 - Derivados cárneos de aves e as respectivas quantidades permitidas de Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Ave.....	31
TABELA 04 - Conteúdo de compostos Fenólicos Totais e Flavonóides nos extratos de erva mate, marcela, da mistura de extratos de erva mate e marcela, do extrato de chá verde e do extrato de própolis sem álcool ¹	70
TABELA 05 - Valores médios de IC ₅₀ (DPPH), EC ₅₀ (Poder de Redução) e Capacidade Antioxidante Total (Método Fosfomolibdênio) dos extratos de erva mate, marcela, da mistura dos extratos de erva mate e marcela, do extrato de chá verde, do extrato de própolis sem álcool e dos padrões ¹	73
TABELA 06 - Valores médios de TBARS e de pH da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.....	81
TABELA 07 - Efeito de extratos naturais sobre os valores médios de TBARS, de pH e da cor superficial (L^* , a^* , b^*) da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.....	82
TABELA 08 – Valores médios para a Luminosidade (L^*), cor vermelha (a^*) e cor amarela (b^*) na superfície da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.....	90
TABELA 09 – Valores médios para a Luminosidade (L^*), cor vermelha (a^*) e cor amarela (b^*) na parte interna da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.....	91
TABELA 10 - Efeito dos extratos naturais sobre os microrganismos da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias (resultados expressos como Log ₁₀ UFC/g amostra).....	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – Absorbância

BHA - Butilhidroxianisol

CMS – Carne Mecanicamente Separada

°C – Graus Celsius

DPPH – Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil

EAG – Equivalente-grama do Ácido Gálico

ECAT – Equivalente-grama de (+)-catequina

EC₅₀ – Concentração Efetiva (*Effective concentration*)

IC₅₀ – Concentração Inibitória (*Inhibitory concentration*)

g – Grama

g – Força centrífuga relativa

L – litro

MA – Malonaldeído

mg – Miligrama

mg eq. – Miligrama equivalente

mL – Mililitro

N – Normal

pH – Potencial Hidrogeniônico

TBA – Ácido 2-tiobarbitúrico (*Thiobarbituric acid*)

TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

μL - Microlitro

μmol – Micromol

% - Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 Mercado de carnes	21
3.2 Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Aves	22
3.2.1 Legislação	24
3.2.1.1 Definição.....	24
3.2.1.2 Composição e requisitos	24
3.2.1.3 Conservação da Carne Mecanicamente Separada.....	25
3.2.1.4 Características sensoriais	25
3.2.1.5 Características físico-químicas	25
3.2.1.6 Características microbiológicas	26
3.2.2 Equipamento	26
3.2.3 Fatores que influenciam nas características e na qualidade da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Ave.....	28
3.2.3.1 Tipo e origem da matéria prima	29
3.2.3.2 Tipo de abate/desossa	30
3.2.3.3 Tipo e regulagem do equipamento	30
3.2.3.4 Rendimento aplicado	30
3.2.4 Uso da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Ave.....	31
3.2.5 Microbiologia da Carne de Frango	32
3.2.6 Cor da Carne	34
3.2.7 TBA (Ácido 2-tiobarbitúrico) e Malonaldeído	37
3.3 Oxidação Lipídica	38
3.3.1 Mecanismos da Oxidação Lipídica	39
3.4 Antioxidantes	40
3.4.2 Antioxidantes Sintéticos	42
3.4.2.1 Antioxidante Sintético BHA	43
3.4.3 Antioxidantes Naturais	44

3.5 Compostos Fenólicos e Flavonóides.....	47
3.5.1 Marcela (<i>Achyrocline satureioides</i>)	49
3.5.2 Erva mate (<i>Ilex Paraguariensis</i>)	49
3.5.3 Chá verde (<i>Camellia Sinensis</i>).....	50
3.5.4 Própolis.....	51
3.6 Determinação de Compostos Fenólicos	52
3.7 Métodos para Avaliação da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	53
3.7.1 Paradoxo Polar.....	54
4 MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1 Materiais.....	56
4.1.1 Matéria prima.....	56
4.1.2 Equipamentos.....	56
4.1.3 Reagentes.....	57
4.2 Métodos	57
4.2.1 Preparo do extrato de Marcela	57
4.2.2 Preparo do extrato de erva mate.....	58
4.3 Análises nos extratos	58
4.3.1 Preparo das soluções estoque dos extratos	58
4.3.2 Conteúdo de Fenólicos Totais.....	58
4.3.3 Conteúdo de Flavonóides Totais.....	59
4.3.4 Atividade Antioxidante	59
4.3.4.1 Capacidade de seqüestro do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH)	59
4.3.4.2 Poder de redução	60
4.3.4.3 Capacidade Antioxidante Total (Método do Fosfomolibdênio)	61
4.4 Delineamento experimental	61
4.4.1 Aplicação dos extratos naturais e do antioxidante sintético na CMS	61
4.5 Análises Físico-Químicas na Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Frango	63
4.5.1 Determinação do pH (Potencial hidrogeniônico)	63
4.5.2 Determinação do Índice de Peróxido	63
4.5.3 Índice de TBARS	64
4.5.4 Análise de Cor.....	64
4.5.5 Foto.....	64
4.5.6 Análise Sensorial.....	65
4.6 Análises Microbiológicas na Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Frango	65

4.6.1 Contagem de <i>Clostridium perfringens</i>	65
4.6.2 Contagem de <i>Salmonella</i>	66
4.6.3 Contagem de Aeróbios Mesófilos Totais	67
4.6.4 Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	68
4.6.5 Contagem de <i>E. coli</i> e de Coliformes Totais	68
4.6.6 Contagem de Bactérias Lácticas	69
4.7 Análise Estatística	69
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
5.1 Fenólicos e Flavonóides.....	70
5.2 Atividade Antioxidante	73
5.3 pH	78
5.4 Índice de TBARS.....	79
5.5 Índice de Peróxido.....	86
5.6 Cor L^*, a^*, b^* e Fotos.....	86
5.7 Estabilidade Microbiológica	96
6 CONCLUSÕES.....	106
7 SUGESTÕES	107
8 REFERÊNCIAS.....	108

1 INTRODUÇÃO

A produção de carne de frango no Brasil em 2007 foi de 10,2 milhões de toneladas, resultado que manteve o país no terceiro lugar entre os maiores produtores mundiais (ABEF, 2008). Calcula-se que pelo menos 20% das carcaças de frango de corte frescos sejam transformados em carne mecanicamente separada (CMS) de ave (NEGRÃO et al., 2005). Desta forma, é possível estimar que aproximadamente 2,04 milhões de toneladas de carne mecanicamente separada (CMS) de ave foram produzidas no Brasil em 2007.

A indústria avícola apresentou nos últimos anos grande evolução na exportação de cortes de frango bem como na industrialização de seus produtos.

Com o aumento do número de abatedouros e conseqüente aumento das quantidades de cortes e produtos de frango desossados manualmente, mais matérias primas com baixo ou mesmo sem valor comercial são produzidos. Dentro desse grupo de matérias primas podemos citar o dorso, o pescoço, os ossos de peito, as pontas de asa, os recortes com ossos, a caixa torácica, os produtos lesionados, cujo valor alimentar e comercial são menores. Apesar disso ainda há neles significativa quantidade de carne, cuja retirada manual é difícil e economicamente inviável. Daí a necessidade do uso da tecnologia de recuperação mecânica, visando aproveitamento da carne presente nestas partes, que representa cerca de 15 a 25% da carne existente na carcaça (BERAQUET, 2000). O dorso e o pescoço, por exemplo, contêm cerca de 70% de carne recuperável mecanicamente (BERAQUET, 1989).

A obtenção da carne mecanicamente separada (CMS) de ave é uma tecnologia muito importante nas indústrias, uma vez que transforma essas matérias primas consideradas pouco nobres ou mesmo sem valor comercial, em carne com valor protéico de boa qualidade. Por essa razão e também por se tratar de uma matéria prima de baixo custo, a carne mecanicamente separada (CMS) de ave é largamente utilizada como fonte de proteína na formulação de produtos industrializados.

A sua utilização, no entanto, é limitada pelas suas propriedades tecnológicas, ou seja, elasticidade, capacidade de ligação e retenção de água, poder emulsificante e estabilidade de emulsão; pela legislação, pois no Brasil a utilização da CMS como matéria prima é limitada de acordo com cada produto/grupos de produto em até 60%, sendo seu uso proibido em produtos cárneos frescos (BRASIL, 2000b) e também pela aceitação do consumidor.

Segundo o Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento (MAPA, 2000a) entende-se por carne mecanicamente separada (CMS) de ave a carne retirada a partir da carne crua de ave, de ossos, carcaças ou partes da carcaça, com exceção dos ossos da cabeça e dos pés, submetidos ao processo mecânico de moagem e separação de ossos de animais de açougue, destinada a elaboração de produtos cárneos específicos.

Devido a natureza de seu processo, sua composição e tendência a rápida oxidação, essa carne tem vida de prateleira curta e que varia de acordo com a temperatura em que é conservada.

Segundo Mitsumoto et al. (2005), carnes moídas estão sujeitas a mudanças oxidativas e desenvolvimento de rancidez mais rapidamente que os músculos íntegros, uma vez que estão mais expostas ao ar e a contaminação microbológica.

A oxidação lipídica é responsável por várias alterações em alimentos, como pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis que tornam os alimentos impróprios para o consumo, por provocar outras alterações que irão afetar a qualidade nutricional devido a degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, e também por afetar a integridade e a segurança dos alimentos, através da formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos (SILVA et al., 1999; KUBOW, 1993; YANG et al., 2002).

Por ser um fenômeno com implicação direta no valor comercial (SILVA et al., 1999), por ser fator limitante de qualidade, aceitação e estabilidade da carne e dos produtos cárneos que a partir dessa matéria prima serão fabricados (BOU et al., 2001; BELTRAN et al., 2003), medidas como o uso de compostos antioxidantes vêm sendo usadas, com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica.

Das centenas de compostos que têm sido propostos para inibir a deterioração oxidativa, somente alguns podem ser usados em produtos para consumo humano (RAMALHO; JORGE, 2006). Na seleção de antioxidantes, são desejáveis propriedades como a eficácia em baixas concentrações, ausência de efeitos indesejáveis nas características sensoriais (cor, odor, sabor) do alimento, compatibilidade com o alimento, fácil aplicação, estabilidade nas condições de processo, armazenamento e não podem ser tóxicos. Além disso, deve-se considerar também fatores como a legislação vigente e o custo na escolha e utilização do antioxidante em escala industrial.

BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno), TBHQ (butilhidroxiquinona terciária), e PG (propil galato) são os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos (SOUSA et al., 2007). Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem efeito tóxico (WÜRTZEN, 1990).

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm se dirigido no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles (SOARES, 2002).

Apesar da legislação brasileira atual não permitir a adição de ingredientes na carne mecanicamente separada (CMS) de ave, muito se tem estudado sobre a aplicação e efeitos de antioxidantes sintéticos e naturais nesse produto, visando o aumento de vida útil do mesmo, sem comprometimento a saúde do consumidor.

Dentro desse cenário, esse projeto teve como principal objetivo avaliar o potencial antioxidante dos extratos naturais de chá verde, erva mate, marcela, da mistura de erva mate com marcela e do própolis sem álcool e seu efeito na estabilidade oxidativa da carne mecanicamente separada (CMS) de ave, armazenada durante 10 dias sob refrigeração. Visando facilitar a comparação de resultados também foi utilizado nesse trabalho o antioxidante sintético BHA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial antioxidante de cinco diferentes extratos naturais: chá verde, erva mate, marcela, da mistura de erva mate com marcela e do própolis sem álcool na estabilidade oxidativa da carne mecanicamente separada (CMS) de frango, armazenada durante 10 dias sob refrigeração de 0 a +4°C. O antioxidante sintético BHA foi utilizado como controle positivo.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar, através de extrações hidro-etanólicas os extratos brutos de erva mate e de marcela. Obter demais antioxidantes junto a fornecedores (produtos comerciais);
- Determinar o conteúdo de fenólicos, flavonóides e capacidade antioxidante nos extratos;
- Aplicar os antioxidantes naturais e o antioxidante sintético BHA na Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango;
- Avaliar o efeito dos extratos na estabilidade oxidativa e na inibição microbiana, através de análises físico-químicas e microbiológicas na Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mercado de Carnes

A avicultura brasileira vem desempenhando papel importante na economia, graças entre outros fatores, aos investimentos em qualidade e sanidade de nossos produtos, que propiciam a abertura de novos mercados.

Segundo a ABEF (2007), as exportações de carne de frango em 2007 tiveram um aumento de 21% em relação a 2006, o que significa um recorde na história do setor.

A tabela 01 mostra os volumes em tonelada de carne brasileira exportados em 2007.

Tabela 01- Volumes em tonelada de carne brasileira exportados em 2007

	Volume (ton.)	Participação (%)
Frango	3.286.775	49,78
Bovina	2.532.223	38,35
Suína	606.513	9,19
Peru	177.330	2,69
Total	6.602.841	100,00

Fonte: ABEF (2007).

De acordo com o desempenho por segmentos, os cortes de frango representaram um aumento de 12% em relação ao ano anterior. Esse segmento teve como principais mercados a Ásia (principalmente Japão e Hong-Kong) e a União Européia (com destaque para países Baixos e Alemanha).

A tabela 02 mostra os volumes em tonelada de carne de frango por produto exportados em 2007.

A produção mundial de carne de frango, segundo o United States Department of Agriculture (USDA), registrou em 2007 um aumento de 6,2%, passando de 64 milhões de toneladas para 68 milhões de toneladas. A produção do Brasil em 2007 foi de 10,2 milhões de toneladas, resultado que manteve o país no terceiro lugar entre os maiores produtores

mundiais, atrás somente de Estados Unidos e China, que apresentaram produção de 16,2 e 11,5 milhões de toneladas, respectivamente. O Brasil teve participação de 45% nas vendas no mercado internacional, mantendo sua posição de maior exportador mundial de carne de frango.

Tabela 02- Volumes em tonelada de carne de frango por produto exportado em 2007.

	Volume (ton.)	Participação (%)
Cortes	1.840.255.561	55,99
Inteiros	1.166.848.083	35,50
Industrializados	155.341.155	4,73
Carnes Salgadas	124.360.207	3,78
Total	3.286.775.006	100,00

Fonte: ABEF (2007).

O aumento expressivo na produção de cortes de frango tem impacto direto no aumento da quantidade de matérias primas disponíveis para a fabricação de carne mecanicamente separada (CMS) de frango.

3.2 Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Aves

Em nenhum outro país a CMS de ave se tornou matéria prima para a elaboração de produtos cárneos tão importante como no Brasil. De tímido e inexpressivo início de produção nos anos 70, com tecnologia de separação rudimentar e com pouco conhecimento de suas propriedades, difícil seria imaginar a importância que essa matéria prima tomaria a partir dos anos 90. De acordo com Field (1988), atribui-se o início da separação mecânica de carne a empresas japonesas no período pós-Segunda Guerra Mundial. A carne mecanicamente separada (CMS) de ave surgiu no final da década de 50, nos Estados Unidos. O surgimento da CMS se deu pela preferência dos consumidores por cortes de frangos e filés ao invés dos frangos inteiros. A predileção por cortes de frango despertou a necessidade de encontrar meios para o aproveitamento de dorsos, pescoços e ossos resultantes da desossa manual.

Dessa forma, a CMS de aves começou a ser utilizada na fabricação de inúmeros produtos como mortadelas, salsichas e salames (TRINDADE et al., 2004).

O grande volume disponível, seu custo reduzido comparado com outras matérias primas e o baixo poder aquisitivo de boa parte da população estimularam o expressivo desenvolvimento tecnológico ocorrido nos últimos anos na obtenção e aproveitamento da CMS, que se tornou uma das mais importantes matérias primas da indústria da carne no Brasil (DEGENHARDT, 2006).

Para melhor visualização sobre a etapa onde ocorre o processamento da carne mecanicamente separada de ave, segue esquema que demonstra o processo geral de abate:

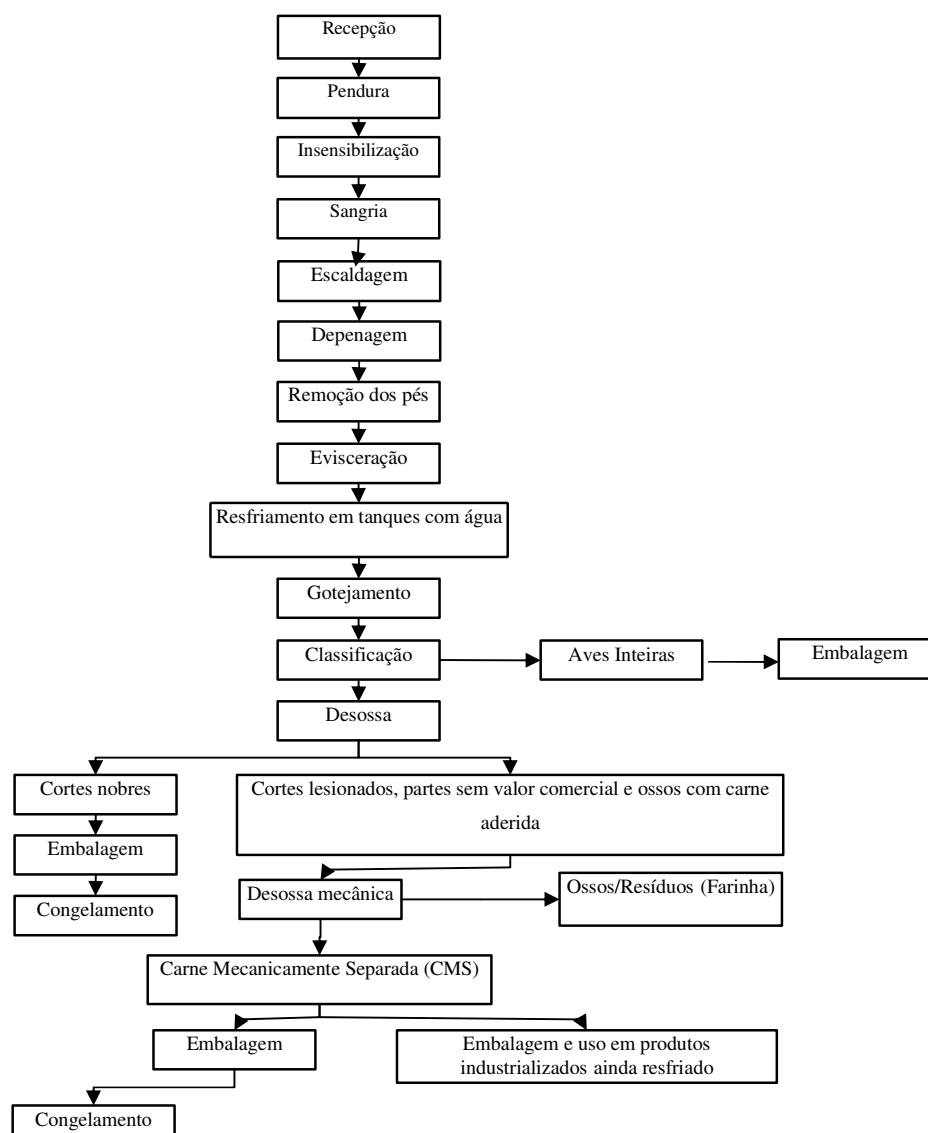


Figura 01- Fluxograma genérico de um abate de aves

3.2.1 Legislação

Segundo Brasil (2000a), seguem alguns dos parâmetros do Regulamento Técnico que estabelece a Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Aves, Bovinos e Suínos, Regulamento este aprovado pela Instrução Normativa nº 4 de 31 de março de 2000:

3.2.1.1 Definição

A Legislação Brasileira define a Carne Mecanicamente Separada (CMS) como sendo a carne obtida por processo mecânico de moagem e separação de ossos de animais de açougue, destinada a elaboração de produtos cárneos específicos.

3.2.1.2 Composição e requisitos

Composição: serão utilizados unicamente ossos, carcaças ou partes de carcaças de animais de açougue, que tenham sido aprovados para consumo humano pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). Não poderão ser utilizados cabeças, pés e patas.

Requisitos: ossos, carcaças e partes da carcaça conservados em temperatura de até +10°C ou +4°C ou 0°C devem ser separados em um prazo não superior a 5, 24 e 48 horas, respectivamente.

Os ossos das carcaças ou partes das carcaças não devem ser acumulados na sala de separação. A carne mecanicamente separada deverá seguir imediatamente para refrigeração ou congelamento. A sala de separação mecânica deverá ser exclusiva para tal finalidade. A temperatura da sala não deverá ser superior a +10°C.

3.2.1.3 Conservação da Carne Mecanicamente Separada

Se refrigerada até 0°C ou 4°C, poderá ser utilizada em até 72 ou 24 horas, respectivamente. Se congelada a -18°C, poderá ser consumida em no máximo 90 dias.

3.2.1.4 Características sensoriais

Cor e odor característicos, textura pastosa.

3.2.1.5 Características físico-químicas

Proteína (mínimo)	12 %
Gordura (máximo)	30%
Teor de Cálcio (máximo) (base seca)	1,5%
Diâmetro dos Ossos	98% deverão ter tamanho máx. de 0,5 mm
Largura (máxima)	de 0,85 mm
Índice de peróxido (máximo)	1 mEq KOH por kg de gordura

Quadro 01- Características físico-químicas da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Ave

3.2.1.6 Características microbiológicas

Microrganismo	Categoria	Critério de Aceitação	Método das análises
<i>Salmonella</i>	10	n=5, c=2 25g	APHA-1992, ou FDA 7th Ed., 1992. ISO
<i>S. aureus</i> (UFC/g)	07	n=5, c=2 m=5x10 ² M=5x10 ³	APHA-1992, ou FDA 7th Ed., 1992.
<i>Clostridium perfringens</i> (UFC/g)	07	n=5, c=2 m=1x10 ² M=1x10 ³	FDA 7th Ed., 1992.

Quadro 02 - Características microbiológicas da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Ave

Legenda :

n = número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente.

c = número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M.

m = limite que separa o lote aceitável do lote com qualidade intermediária aceitável.

M = limite que separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis.

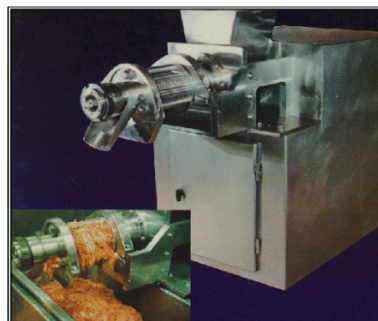
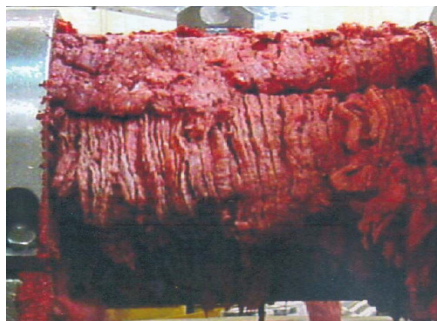
3.2.2 Equipamento

O processo mais comumente utilizado consiste em cortar a matéria prima inicial, separar tendões e ossos da carne utilizando uma rosca sem fim no interior do equipamento para forçar sua passagem pelos cilindros perfurados ou placas justapostas com um espaço entre si que funcionam como uma peneira (NUNES, 2003).

Existem vários fabricantes de equipamentos para essa finalidade. O equipamento utilizado nesse projeto foi fornecido por um fabricante do Canadá, sendo seu princípio de funcionamento da seguinte forma: os ossos com resíduos de carne são transportados através de uma rosca sem fim, desenhada de forma tal que a medida que os ossos são conduzidos para o cabeçote separador há um aumento significativo de pressão. A pressão é aumentada gradativamente, forçando a passagem da carne pelas aberturas formadas pela superposição de lâminas circulares que atuam de forma a cortar a carne aderida aos ossos, sendo expelida na

forma de CMS. Os ossos são descarregados no final do eixo pelo anel de restrição, na forma de ossos compactados.

As figuras abaixo servem para melhor ilustrar o processo de obtenção de carne mecanicamente separada (CMS) de ave:



Figuras 02 e 03 - Máquina de separação mecânica de carne (Fontes: Degenhardt, 2006 e Roque, 1996).



Figura 04 - Produção de Carne Mecanicamente Separada (CMS) de ave em escala industrial (Fonte: Gouvêa, 2007).

A figura 04 apresenta algumas etapas da produção da carne mecanicamente separada (CMS) de ave em escala industrial. Diferentes matérias primas podem ser utilizadas para a produção da CMS. Na foto 01 vemos dorsos com pescoço e anca ainda pendurados na nórea,

sendo em seguida direcionados para a máquina de CMS (foto 02). As fotos 03 e 04 mostram, respectivamente, a carne mecanicamente separada sendo extraída e acondicionada em recipiente de inox antes de ser embalada. A foto 05 ilustra os ossos compactados extraídos durante o processo.

3.2.3 Fatores que influenciam nas características e na qualidade da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Ave

A carne de frango tem normalmente pH próximo de 6,0, enquanto a CMS apresenta valores mais altos, próximos a neutralidade, sendo esses valores favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos, prejudicando dessa forma a qualidade da CMS bem como dos produtos que a incorporam. Além do pH, a CMS também apresenta elevada atividade de água, o que também favorece as alterações microbiológicas bem como a oxidação (GALVÃO, 1992). A matéria prima para CMS apresenta elevada carga microbiana como consequência da contaminação introduzida durante o processo. As pequenas partículas, a grande área de superfície, a liberação de fluidos celulares ricos em nutrientes devido a maceração do tecido e ao calor gerado durante o processo de desossa mecânica propiciam o desenvolvimento bacteriológico (KUMAR et al., 1986).

Devido a sua composição, seu estado físico e o elevado pH, a CMS constitui-se em um meio adequado para a proliferação bacteriana gerando como consequência uma menor vida útil sob refrigeração. De acordo com Nunes (2003), a CMS apresenta carga microbiana semelhante à carne moída, e se esses produtos forem então manipulados e processados adequadamente, pode-se dizer que o crescimento bacteriológico pode ser controlado. Em geral, pode-se dizer que, se o número de bactérias na superfície da carne exceder $1,0 \times 10^8$ UFC/g, a carne será inviável para o consumo humano; sendo assim, uma matéria prima com essa contagem microbiana não poderá ser destinada para a produção de CMS (NURMI; RING, 1999).

A composição química da CMS apresenta uma grande variação em função de vários fatores, como da maior ou menor incorporação da medula óssea e partículas de ossos, da espécie e idade dos animais, do tipo de ossos processados, do método de desossa, do equipamento, da regulagem da máquina, da trituração prévia dos ossos, da razão carne/osso e da quantidade de pele e gordura adicionadas (MEECH; KIRK, 1986; FERNANDEZ, 1986;

NEWMANN, 1981; NEWMANN, 1983; NORNBORG et al., 1994; KUEHNE et al., 1986; OHTAKE, 1983; GANDEMER, 1990).

3.2.3.1 Tipo e origem da matéria prima

A CMS é composta de tecidos musculares, conectivos e adiposos, podendo variar de acordo com a qualidade da matéria prima. O tipo de matéria prima utilizada influencia no rendimento e na qualidade da CMS. Rendimentos, teor de cálcio, ferro, coloração - quantidade de pigmentos heme que confere cor escura ao produto (NUNES, 2003) e a composição em proteínas, umidade e gordura variam de acordo com a matéria prima que será utilizada para produzir a CMS.

O processamento de osso com maior teor de tutano implica em uma CMS com alto teor de gordura e hemeproteínas que sofrem facilmente oxidação (BERAQUET, 1990). Na literatura encontrou-se por exemplo, valores de proteína variando de 9,3% a 14,5% e de gordura de 14,4% a 27,2%, sendo nestes casos o pescoço e dorso de frango utilizados como matéria prima (FRONING, 1981). Outros fatores que influenciam a composição e qualidade da CMS são a relação músculo-osso, linhagem, sexo e a idade das aves (a calcificação, o teor e tipo de colágeno aumentam com a idade das aves, ossos se tornam mais duros e quebradiços e dessa forma se comportam de forma diferente durante a extração mecânica, impactando no resultado final).

Segundo Silveira (1994), o processo de desossa mecânica causa considerável ruptura celular, resultando numa carne de composição diferente da matéria prima original. O teor de gordura em geral é mais alto devido a incorporação de lipídios existentes na gordura subcutânea e no tutano.

Algumas das matérias primas que podem ser utilizadas para a produção de CMS são: dorso (com ou sem pescoço, com ou sem pele, com ou sem anca – e conseqüentemente com ou sem gordura abdominal, com ou sem cartilagem do peito, com ou sem sambiquira), poedeiras e/ou matrizes de descarte (carcaças inteiras ou não), pescoço (com ou sem pele), porção frontal / torácica, resultante da desossa da carcaça e outros ossos.

3.2.3.2 Tipo de abate/desossa

As operações de abate também influenciam na composição da CMS. Muita absorção de água durante o resfriamento e a operação de gotejamento deficientes vão aumentar o teor de umidade da CMS e diminuir seu teor de proteína (BERAQUET, 1990). A forma como se obtém os cortes, com maior ou menor teor de músculos e gorduras nos ossos, afetam de forma determinante a composição e característica da CMS (DEGENHARDT, 2006).

3.2.3.3 Tipo e regulação do equipamento

Muitos fatores relacionados com o equipamento podem afetar a qualidade do produto final. Por exemplo, a pressão aplicada sobre a matéria prima, quando aumentada, permite uma maior quantidade de ossos, tendões e outros resíduos não cárneos no produto final, tornando o processo sensivelmente menos eficiente, resultando em material com maiores teores de gordura e mineral. A manutenção do equipamento é um fator importante na qualidade da CMS (FRONING, 1981). As superfícies cortantes devem estar sempre afiadas, pois influenciam na textura e consistência do produto final. A forma construtiva do equipamento de desossa, se o mesmo gera a pressão necessária para a separação sem quebrar em demasia os ossos, o cabeçote separador, a forma e o tamanho das aberturas e a regulação em termos de rendimento são determinantes sobre a composição e características do produto final (DEGENHARDT, 2006).

3.2.3.4 Rendimento aplicado

Segundo Froning (1981), o rendimento da CMS pode variar de 55 a 70%, dependendo da pressão aplicada sobre a matéria prima. Quanto maior o rendimento, maior a quantidade de cinzas e lipídeos no produto final. Atualmente sabe-se que o rendimento da CMS pode atingir até 80%.

3.2.4 Uso da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Ave

A qualidade da CMS é fator primordial para a definição quanto ao seu uso na indústria.

A CMS é uma matéria prima de baixo custo, cuja textura é pastosa, fina e uniforme (SOUSA et al., 2003). É para a agroindústria uma opção de agregar valor a um produto com baixo (ou sem) valor comercial, reduzir custos de formulação e de evitar prejuízos, aproveitando com o processo de separação mecânica toneladas de matérias primas que poderiam ser descartadas ou mesmo utilizadas para outros fins menos nobres.

Na fabricação de produtos derivados da carne alguns limites devem ser respeitados quanto aos níveis de CMS incorporados ao produto. A legislação brasileira permite a utilização dessa matéria prima apenas em produtos cárneos industrializados cozidos específicos (MAPA, 2000b). A tabela 03 mostra tais limites em alguns produtos:

Tabela 03 – Derivados cárneos de aves e as respectivas quantidades permitidas de Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Ave

Produtos	Quantidade de CMS
Mortadela	Máximo 60%
Lingüiça	Máximo 20%
Salsicha	Máximo 60%
Almôndega *	Máximo 30%
Hambúrguer *	Máximo 30%
Fiambre	Máximo 30%

* Cozidos.

Fonte: MAPA, 2000b.

3.2.5 Microbiologia da Carne de Frango

A segurança microbiológica e a qualidade da carne de frango são igualmente importantes para produtores, mercadistas e consumidores. Dois grupos de microrganismos são relevantes: os patógenos e os organismos psicrotróficos, capazes de se multiplicar durante estocagem em temperaturas de resfriamento (MEAD, 2004). Dessa forma, a pesquisa de microrganismos patogênicos e/ou indicadores auxiliam na verificação da qualidade do alimento consumido (LÍRIO et al., 1998).

A vida de prateleira de um produto depende de vários fatores. A presença de microrganismos é um dos mais importantes. Daí a necessidade dos controles durante todas as etapas de produção, estocagem e manuseio do alimento.

Predominam nas aves vivas microrganismos aeróbios mesófilos, sendo que poucos conseguem se desenvolver em temperaturas abaixo de 7°C. Sua presença tem sido usada como indicador de qualidade higiênica dos alimentos. Se em grande número, indica falhas durante a produção (CARDOSO et al., 2005).

Já, nas carcaças, predominam microrganismos psicrotróficos, que se multiplicam em temperaturas inferiores a 0°C e são responsáveis pela maioria das alterações dos produtos (VIEIRA; TEIXEIRA, 1997).

As bactérias do grupo dos coliformes habitam o trato intestinal de humanos e animais e indicam contaminação de origem ambiental e fecal no produto (MOTTA; BELMONT, 2000).

De acordo com Franco e Landgraf (1996), as bactérias são as principais causadoras da deterioração da carne de frango, sendo o conteúdo intestinal a fonte primária desses microrganismos. A maioria delas cresce na superfície (pele, parte interna da cavidade do corpo e qualquer superfície cortada), com os produtos de decomposição difundindo-se vagarosamente para o interior da carne. Odores estranhos podem ser notados quando a contagem bacteriana atinge aproximadamente 2,5 milhões de UFC/cm². Em frango eviscerado mantido a 10°C ou abaixo, a deterioração ocorre principalmente por *Pseudomonas* e leveduras (*Torulopsis* e *Rhodotorula*).

A enumeração de coliformes totais é utilizada para avaliar as condições higiênico-sanitárias do produto, pois quando em alto número, indica contaminação decorrente de falha durante o processamento, limpeza inadequada ou tratamento térmico insuficiente (CARVALHO et al., 2005a). Um número elevado de coliformes fecais no alimento indicam

presença de patógenos intestinais, já que predomina neste grupo *Escherichia coli* (PARDI et al., 1993). De acordo com Franco e Landgraf (1996), *E. coli* pode causar reações indesejáveis nos alimentos, além de várias linhagens serem patogênicas para o homem e para animais.

A ocorrência e a quantidade de *Salmonella* presente na carne varia de acordo com as condições de manejo durante a criação, com os cuidados higiênicos nas operações de abate dos animais e posterior manipulação das carcaças (CARVALHO; CORTEZ, 2005). São microrganismos invasivos do frango e podem penetrar órgãos internos ou penetrar profundamente os tecidos do animal, onde é menos facilmente destruído. A *Salmonella* sobrevive bem no ambiente e pode sobreviver na carcaça durante o processo, como na escaldagem, lavagem e no chiller (MEAD, 2004).

Clostridium perfringens é um microrganismo obrigatoriamente anaeróbio, relativamente tolerante ao oxigênio e pode ser encontrado em baixos números no trato alimentar do frango. Quando presente na carne, seu crescimento é favorecido pelas condições nas quais o oxigênio é dissipado pelo cozimento. Entretanto, desde que o crescimento desse microrganismo não pode ocorrer se a carne é mantida abaixo de 15°C, o problema é facilmente evitado pela estocagem sob refrigeração (MEAD, 2004).

Quando a carne de frango é estocada aerobicamente em condições de refrigeração, o organismo que predomina é *Pseudomonas* spp., acompanhado por baixas quantidades de outras bactérias Gram-negativas. Os organismos predominantes na putrefação da carne de frango são usualmente as bactérias ácido-láticas, mas outras bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem ocorrer em grande número (MEAD, 2004).

A Resolução RDC nº12 de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008), estabelece padrão máximo para coliformes fecais em carcaças inteiras, fracionadas ou cortes de até 10⁴ UFC/g.

Na literatura encontram-se poucos dados sobre a qualidade microbiológica da carne mecanicamente separada produzida no Brasil, principalmente em relação à de aves (JÚNIOR; GARCIA, 2007). A legislação brasileira hoje determina para este produto, através da IN nº 4 de 31 de março de 2000, padrões para as bactérias do gênero *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*, conforme descrito no item 3.2.1.6.

3.2.6 Cor da Carne

Os pigmentos presentes na carne são constituídos, principalmente, por duas proteínas: a hemoglobina, que é o pigmento do sangue, e a mioglobina, que é o pigmento dos músculos. A mioglobina consiste de uma porção protéica, denominada globina (é uma proteína globular) e de uma porção não-protéica, denominada “anel-heme”. A porção heme do pigmento é importante na determinação da cor da carne, uma vez que esta depende parcialmente do estado químico do ferro presente nesse anel. Se no estado oxidado, o ferro (íon férrico – Fe^{+++}) é incapaz de reagir com outras moléculas. Na forma reduzida (íon ferroso – Fe^{++}), reage rapidamente com a água e o oxigênio molecular (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

As reações de conversão do pigmento heme da forma ferrosa (Fe^{2+}) para a férrica (Fe^{3+}) são, na maioria das vezes, reversíveis e muito dinâmicas. Já, as alterações no anel hemínico e/ou da proteína globular são irreversíveis (LIVINGSTON; BROWN, 1981).

As altas concentrações de gordura poliinsaturada na carne mecanicamente separada (CMS) de aves são susceptíveis a auto-oxidação, que além das deteriorações já mencionadas também provoca alterações da cor da carne. Segundo Hernández et al. (2009), quando ocorre a oxidação lipídica os pigmentos heme (mioglobina e hemoglobina) também oxidam, num sistema acoplado de reações lipídio-pigmento. O resultado é uma mudança de cor.

Podem ocorrer pelo menos 15 estados químicos do pigmento heme, conferindo diversas possibilidades de cor às carnes e produtos cárneos (LAWRIE, 1998).

A cor das carnes frescas é definida pela quantidade relativa de três formas de mioglobina: mioglobina em seu estado reduzido (Mb) de cor vermelha púrpura, oximioglobina (O_2Mb) de cor vermelha brilhante e metamioglobina (MetMb), com a molécula oxidada (Fe^{3+}), de cor marrom (RIZVI, 1981; CORNFORTH, 1994).

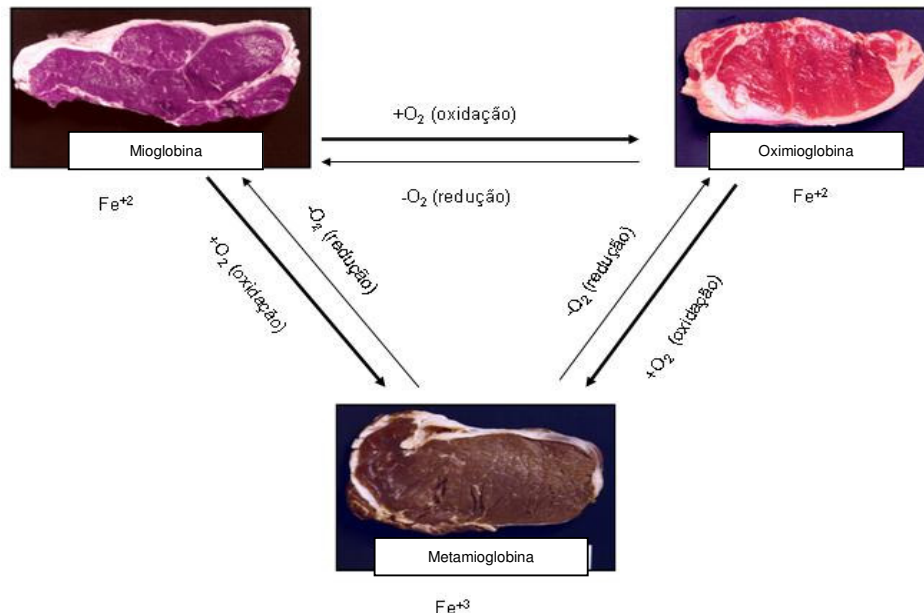


Figura 05 - Esquema da oxidação da mioglobina.

Fonte: Boles; Pegg (2007)

A cor vermelha da carne pode adquirir tons de verde, marrom ou cinza, devido a produção por bactérias, de H_2S , compostos oxidantes como peróxidos, por exemplo (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Em produtos cárneos, o esverdeamento é uma das principais cores indesejáveis, pois indica que o produto sofreu graves alterações na sua qualidade, sejam estas de ordem físico-química e/ou microbiológica. Nessas condições, o produto além de não ser atrativo torna-se também impróprio para o consumo.

A cor da CMS é mais escura e mais vermelha que a da carne desossada manualmente devido a extração dos pigmentos hemáticos da medula óssea, ricos em ferro (FERNANDEZ, 1986; BERAQUET, 1989; DAWSON; GARTNER, 1983; LEE et al., 1975; NEWMANN, 1981).

Na análise de cor pelo Sistema *Cielab* (L^* , a^* , b^*) medida instrumentalmente com um colorímetro ou com um espectrofotômetro, o valor de L^* , situado no eixo vertical do diagrama de Hunter (figura 06), mede a luminosidade ou a percentagem de reflectância, variando de 0 (preto) até 100 (branco). O valor de a^* , situado no eixo horizontal, mede a variação entre a cor vermelha ($+a^*$) e a verde ($-a^*$) e o valor de b^* mede a variação entre o amarelo ($+b^*$) e o azul ($-b^*$).

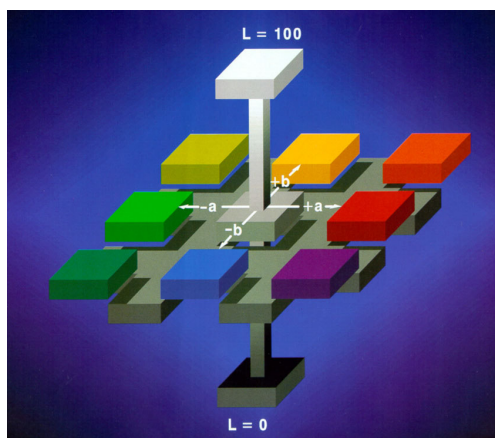


Figura 06 – Diagrama de Hunter mostrando as variáveis L^* , a^* , b^* .
 Fonte: Pereira (2002).

De acordo com Olivo et al. (2006), a cor observada na superfície das carnes é o resultado da absorção seletiva pela mioglobina, provocada pela distribuição da luz que emerge da carne.

O valor L^* é utilizado, segundo Barbut (1993), para caracterizar a condição PSE da carne. Isso porque existe correlação inversa entre os valores de pH e de L^* , ou seja, quanto menor o pH maior será o valor de L^* e vice-versa (OLIVO et al., 2006).

Stewart et al. (1965) propuseram que a razão entre valores positivos do componente a^* e os valores positivos do componente b^* do Sistema *Cielab*, pode ser usada para determinar, de forma indireta, o teor de oximioglobina e de metamioglobina presentes na superfície de carnes. Segundo Pereira (2002), com este procedimento, quando comparado entre duas ou mais amostras, o valor superior indica maior teor de oximioglobina (a forma oxigenada da mioglobina, de cor vermelho vivo) em detrimento de metamioglobina (a forma oxidada da mioglobina, de cor marrom-amarelada ou pálida). Esta análise também é utilizada como indicadora da desnaturação da molécula de mioglobina (OLIVO, 1999).

A análise instrumental da cor da carne segundo o sistema *Cielab* fornece informações numéricas sobre a qualidade e possíveis alterações de cor que a mesma possa sofrer ao longo do período de armazenamento.

3.2.7 TBA (Ácido 2-tiobarbitúrico) e Malonaldeído

Existem vários métodos utilizados no controle de qualidade de alimentos que contém gordura, caso dos produtos cárneos. Testes como índice de peróxido e TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) geram informações importantes em relação ao estado oxidativo e consequente tendência a rancidez do alimento analisado.

A fração fosfolipídica da carne mecanicamente separada (CMS) de ave é altamente insaturada e, portanto, muito susceptível a oxidação, mostrando um grande potencial para produzir substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) (DAWSON; GARTNER, 1983).

O teste de TBA quantifica o malonaldeído, um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo (OSAWA et al., 2005). O malonaldeído é um aldeído de cadeia curta, cuja concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos.

A reação envolve o ácido 2-tiobarbitúrico com o malonaldeído (figura 07), produzindo um composto de cor vermelha, medido espectrofotometricamente a 532 nm de comprimento de onda (de acordo com a metodologia, esse comprimento de onda pode variar, situando-se ao redor de 500 a 550 nm) (OSAWA et al., 2005).

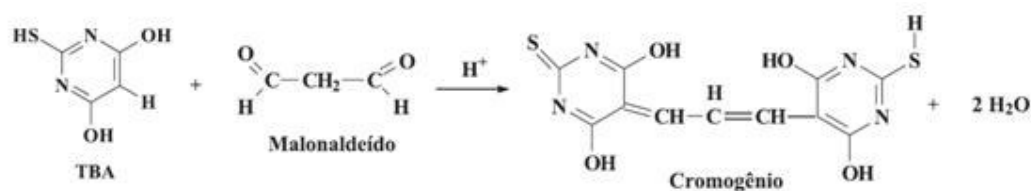


Figura 07 - Reação do teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido, medido espectrofotometricamente (OSAWA et al., 2005).

Diversos autores sugerem metodologias diferenciadas para a análise de TBA. Para Fernández et al. (1997) por exemplo, o teste de TBA quando realizado com o procedimento

de destilação, é considerado ser mais sensível e também mais adequado para amostras com alto teor de gordura (> 10%), onde a turbidez pode ocorrer nas amostras extraídas.

Segundo Addis et al. (1983) e Pearson et al. (1983), o malonaldeído, produto secundário da oxidação lipídica, pode ser tóxico às células vivas, podendo ser formado “in vivo” ou pré-formado em alimentos. Shamberger et al. (1974) e Pearson et al. (1983) sugerem que o malonaldeído seja cancerígeno. Mukai e Goldstein (1976) sugerem que o malonaldeído seja mutagênico.

3.3 Oxidação Lipídica

Um dos maiores desafios para a indústria de carnes é oferecer produtos macios, suculentos e com cor e sabor agradáveis, e que estas características de frescor mantenham-se estáveis durante toda a vida de prateleira, com a maior segurança e o menor custo possíveis.

Os alimentos cárneos, devido a sua riqueza na composição química (umidade, proteínas, gorduras e outros nutrientes) são produtos bastante suscetíveis a alterações de ordem físico-química e microbiológica. Dentre estas alterações, a oxidação lipídica e a oxidação da cor são difíceis de serem controladas, principalmente devido a sua complexidade e variabilidade. São reações de ordem físico-química, podendo ser potencializadas por ação microbiológica (OLIVO et al., 2006).

Os lipídeos são importantes componentes dos produtos cárneos, conferindo características sensoriais desejáveis aos mesmos. De outra maneira, são facilmente oxidáveis, levando a rancificação com a produção de substâncias indesejáveis e comprometendo a qualidade e vida útil dos produtos. As substâncias tóxicas produzidas são cetonas, aldeídos, álcoois, ácidos e hidrocarbonetos, responsáveis pelo odor e gosto característico de ranço (OLIVO et al., 2006).

Temperatura, luz, estresse mecânico extremo, aeração e a natureza da composição da CMS de frango, pigmentos heme, ferro, cobre e magnésio, provenientes da medula óssea, alto teor de gorduras insaturadas e poucos tocoferóis, são outros fatores que aceleram a ocorrência da rancidez oxidativa (AMBIEL; WURLITZER, 2000; COSTA, 1994).

A oxidação é geralmente tratada como a mais frequente forma de ocorrência da deterioração de lipídeos, o qual conduz ao desenvolvimento da rancidez, formação de compostos responsáveis por *off-flavors*, polimerização, reversão e outras reações, causando

redução da vida de prateleira e do valor nutritivo do alimento. Os lipídeos ocorrem na maioria dos alimentos e a maioria (mais de 90%) estão na forma de triacilgliceróis, que são ésteres de ácidos graxos e glicerol. Os dois maiores componentes envolvidos na oxidação lipídica são os ácidos graxos insaturados e o oxigênio (POKORNÝ et al., 2001).

3.3.1 Mecanismos da Oxidação Lipídica

Os lipídios podem ser oxidados de diferentes formas, em função do meio e dos agentes catalisadores. Os mecanismos mais conhecidos são a oxidação enzimática, a fotoxidação e a autoxidação.

A oxidação por via enzimática ocorre por catálise enzimática, por ação da lipoxigenase, que atua sobre os ácidos graxos poliinsaturados (como por exemplo ácidos linoléico e linolênico e seus ésteres), catalisando a adição de oxigênio a cadeia hidrocarbonada poliinsaturada, formando peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas e que podem participar de diferentes reações de degradação (SILVA et al., 1999).

O mecanismo de fotoxidação de gorduras insaturadas é promovido essencialmente pela radiação UV em presença de sensibilizadores (como clorofila, mioglobina e outros) que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e a transferem para o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$), gerando o estado singlete ($^1\text{O}_2$) – forma eletronicamente excitada, consequência da absorção de energia do oxigênio no estado fundamental. O oxigênio singlete reage diretamente com as ligações duplas por adição formando hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência de luz e de sensibilizadores, e que por degradação posterior originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (SILVA et al., 1999).

A autoxidação é o principal mecanismo de oxidação de alimentos, está associada a reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados e ocorre em três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação (COSGROVE et al., 1987, PORTER et al., 1995).

Na etapa de iniciação há a formação dos radicais livres do ácido graxo, devido a remoção de um átomo de hidrogênio de um grupamento metil, adjacente a dupla ligação do ácido graxo insaturado, deixando um elétron desemparelhado no carbono (KAHL; HILDEBRANDT, 1986).

Quando dois elétrons ocupam um mesmo orbital num átomo ou molécula diz-se que eles estão pareados. Quando o elétron está sozinho num orbital diz-se que o átomo ou

molécula é não pareado. Radical livre é qualquer espécie química capaz de existir independentemente, que contém um ou mais elétrons não pareados ocupando orbitais atômicos ou moleculares. Em geral, são instáveis e reagem com diversos compostos e estruturas celulares (HALLIWELL; GUITTERIDGE, 2000).

Durante a propagação, os radicais livres formados na etapa de iniciação são convertidos em outros radicais, formando os produtos primários de oxidação: peróxidos e hidroperóxidos. São os radicais livres formados na etapa inicial os responsáveis pela propagação da reação (SILVA et al., 1999; COUPLAND; MCCLEMENTS, 1996).

Na etapa de terminação ocorre a interrupção das reações em virtude da redução da quantidade de ácido graxo insaturado no sistema, o que faz com que os radicais livres liguem-se entre si formando compostos estáveis (NIKI et al., 2005). Formam-se os produtos secundários de oxidação, obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis) (SILVA et al., 1999).

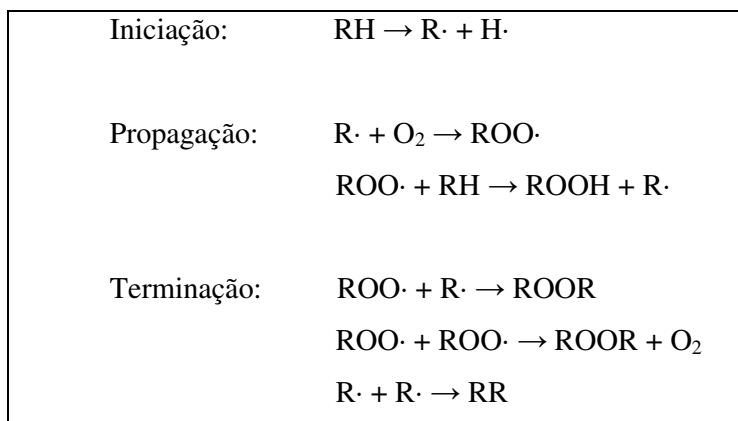


Figura 08 - Mecanismo geral da autoxidação lipídica.

Onde:

RH = ácido graxo insaturado; R· = radical livre;

ROO· = radical peróxido e

ROOH = radical hidroperóxido

3.4 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias usadas para preservar alimentos através do retardo da deterioração, rancidez e descoloração decorrente da autoxidação (ADEGOKE et al., 1998).

Antioxidantes protegem os sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de reações das espécies reativas ao oxigênio, com diversos alvos celulares.

O uso de antioxidantes deve atender aos seguintes requisitos: ser compatível com o substrato, não conferir odor ou sabor estranhos ao produto, ser efetivo durante o período de armazenamento do produto alimentício, ser estável ao processo de aquecimento e ser facilmente incorporado ao alimento (MELO; GUERRA, 2002). Existe uma grande quantidade de compostos, tanto naturais quanto sintéticos, com propriedades antioxidantes, embora para seu uso em alimentos devam ser cumpridos certos requerimentos, sendo um deles a segurança para a saúde (NAWAR, 1996).

A utilização de produtos antioxidantes durante a fase de processamento dos produtos cárneos é um importante recurso adotado pela indústria como forma de retardar as alterações oxidativas nos mesmos.

A incorporação de aditivos com função antioxidante em produtos cárneos é regulamentada pela legislação (BRASIL, 1998). Eles podem ser utilizados individualmente ou combinados, sendo que para esta utilização deve-se ter experiência e conhecimento de causa, garantindo assim a melhor qualidade dos produtos e a segurança alimentar.

3.4.1 Mecanismo de Ação de Antioxidantes

Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia. Os principais e mais conhecidos antioxidantes deste grupo são os polifenóis, usados para retardar o desenvolvimento de produtos cárneos e estender sua validade. Dentre eles podemos citar o BHA, BHT e TBHQ (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1998), o PG – propil galato (MILANI et al., 2002b), que são sintéticos, e os tocoferóis, componentes biologicamente ativos da vitamina E, que são naturais (PORTER et al., 1995). Segundo Morrissey et al. (1998) o mecanismo de ação dos antioxidantes pode ser descrito conforme figura 09.

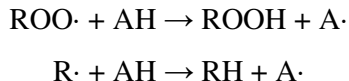


Figura 09 - Mecanismo de ação dos antioxidantes primários

Onde:

ROO· e R· = radicais livres
 AH = antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo
 A· = radical inerte

O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres R· e ROO· com maior facilidade que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Assim, formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte (A·) procedente do antioxidante. Este radical, estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (RAMALHO; JORGE, 2006).

3.4.2 Antioxidantes Sintéticos

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são o BHT (butilhidroxitolueno), BHA (butilhidroxianisol) e TBHQ (butilhidroxiquinona terciária) (BOZKURT, 2006).

No Brasil, o uso de aditivos com função antioxidante em produtos cárneos é definido de acordo com o estabelecido na Portaria número 1004 de 11 de dezembro de 1998. Essa Portaria não autoriza o uso de antioxidantes em carnes frescas e congeladas *in natura*, mas permite a adição por exemplo de BHA e BHT em alguns produtos cárneos industrializados, em quantidades de 0,01 g de antioxidante /100g de produto.

O emprego de agentes antioxidantes sintéticos visando o aumento do prazo de validade de produtos alimentícios tem sido freqüente devido ao seu baixo custo, estabilidade e eficácia. Porém, durante as duas últimas décadas, tanto consumidores quanto a legislação têm levantado suspeitas em relação à inocuidade dos antioxidantes sintéticos (POKORNÝ, 1991).

Por isso há uma tendência geral, no processamento de alimentos, de substituir os antioxidantes sintéticos por ingredientes que naturalmente possuam atividade antioxidante (TSALIKI et al., 1999).

3.4.2.1 Antioxidante Sintético BHA

O BHA é um antioxidante fenólico monohídrico, extremamente solúvel em gorduras e insolúvel em água (GADOW et al., 1997).

O antioxidante sintético BHA produzido em escala comercial é formado por 90% de uma mistura de isômeros 2 e 3 do terciário-butil-4-metoxifenol. É uma substância sólida, cristalina de cor branca ou amarelada, com odor aromático, instável a luz e estável em valores de pH acima de 7,0 (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998).

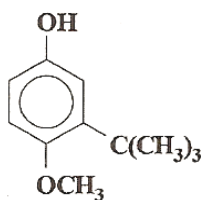


Figura 10 - Estrutura do BHA (Fonte: Araújo, 2004).

É um dos antioxidantes mais eficazes e estáveis em alimentos, sendo bastante utilizado devido a sua resistência a altas temperaturas durante o processamento (GAVA, 1984). O BHA é particularmente útil na proteção da cor e do *flavour* de óleos essenciais, além de ser muito utilizado no controle da oxidação de ácidos graxos de cadeia curta, como os encontrados por exemplo no óleo de côco (PORTER, 1993).

Pode ser usado em combinações com outros antioxidantes visando efeito sinérgico (OETTERER et al., 2006). Possui maior efeito quando usado em combinação por exemplo com BHT (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

3.4.3 Antioxidantes Naturais

A determinação da atividade antioxidante de produtos naturais teve início com Chipault et al. (1952) em especiarias, ingredientes utilizados em alimentos desde os primórdios da história, não somente para melhorar ou ressaltar as características sensoriais dos alimentos, mas também para preservá-los.

O interesse pelos antioxidantes naturais teve início na década de 80 diante da comprovação de efeitos maléficos causados por doses elevadas de BHT (butilhidroxitolueno), BHA (butilhidroxianisol) e TBHQ (butilhidroquinona terciária) sobre o peso do fígado e marcado aumento do retículo endoplasmático, entre outras (DURÁN; PADILLA, 1993). Como consequência, ênfase foi dada à identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante, provenientes de fontes naturais, que pudessem atuar sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e limitar o uso dos antioxidantes sintéticos (POKORNÝ, 1991).

Estudos preliminares demonstraram que alguns extratos de ervas são tão eficientes quanto os antioxidantes sintéticos (HERNÁNDEZ et al., 2009).

Com o aumento da competitividade por mercado, os processadores de carne buscam constantemente alternativas para a produção de produtos cárneos mais saudáveis. Em muitos estudos publicados nos últimos anos, observa-se que a aplicação de antioxidantes naturais tem abrangido toda a cadeia de produção de carnes, não se restringindo apenas nos produtos finais. Uma diversidade de antioxidantes naturais têm sido estudados para tal fim.

Aqui é importante ressaltar a forte presença da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em pesquisas neste assunto, pois através do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (CCR), uma série de trabalhos relacionados ao uso de antioxidantes naturais em alimentos foram publicados nos últimos anos, principalmente na área de carnes, foco deste trabalho.

Terra et al. (2000), verificaram os efeitos antioxidantes e antimicrobianos do extrato de chá preto (*Camellia sinensis*), extrato de alecrim (comercial, fornecido pela CHR Hansen) e lactato de sódio (comercial, fornecido pela Purac) em carne mecanicamente separada de frango, conservada por 15 dias a 5°C e observaram que o extrato de chá preto e o lactato de sódio provocaram inibição no desenvolvimento de microrganismos psicrotóxicos e de coliformes totais, aumentando a estabilidade microbiológica da CMS. O extrato de alecrim, apesar de não ter influenciado no desenvolvimento microbiano, provocou, juntamente com o

lactato de sódio, uma estabilização na oxidação lipídica da CMS até o sexto dia de armazenamento. Após o período de 15 dias constatou-se que todas as amostras apresentaram valores de TBA inferiores ao controle, sendo o lactato de sódio o que demonstrou maior ação antioxidante, seguido pelo extrato de chá preto e extrato de alecrim.

Milani et al. (2001), verificaram os efeitos antioxidantes e antimicrobianos dos extratos alcoólico e metanólico de chá verde, chá preto (*Camellia sinensis*) e de erva mate (*Ilex paraguariensis*) quando incorporados em carne mecanicamente separada de frango, armazenadas a 5°C e a -25°C. Os extratos não proporcionaram proteção antimicrobiana efetiva na CMS de frango, no entanto todos os extratos demonstraram ação antioxidante, quando comparados com a amostra controle (sem antioxidantes). Os extratos metílicos demonstraram ser mais efetivos como antioxidantes quando comparados aos respectivos extratos alcoólicos.

Milani et al. (2002a), verificaram o efeito antioxidante dos extratos hidro-alcoólico e metílico da casca de maçã e folhas de alcachofra e do extrato metílico de erva mate em carne mecanicamente separada (CMS) de frango mantidas a 5°C por 9 dias e a -18°C por 4 meses. Os extratos metílicos de alcachofra e de erva mate apresentaram atividade antioxidante sobre a CMS. O extrato de erva mate demonstrou maior poder antioxidante nas condições deste experimento.

Hoffmann (2003) avaliou a aplicação de antioxidante natural proveniente de extrato bruto de caqui versus extrato de alecrim em diferentes concentrações aplicados em carne mecanicamente separada de frango. O extrato bruto de caqui apresentou efeito antioxidante, sem diferença em relação ao extrato de alecrim.

Terra et al. (2003), avaliaram a ação de diferentes concentrações (0,5% e 1,0%) do antioxidante de erva mate e do antioxidante sintético BHA (0,025%) na melhora da qualidade do salame tipo italiano e constataram que 0,5% do extrato de erva mate e o BHA apresentaram os melhores resultados, parecendo ser viável o uso de 0,5% de extrato de erva mate como substituto do antioxidante BHA no salame tipo italiano.

Furtado et al. (2004a), aplicaram os extratos hidro-etanólicos de marcela (*Achyrocline satureioides*) e de erva mate (*Ilex paraguariensis*) em lingüiça, mantida a 5°C por 35 dias. Os extratos apresentaram ação protetora contra a rancificação da lingüiça, sendo que o extrato hidro-etanólico de marcela apresentou ação superior ao extrato-etanólico de erva mate.

Furtado et al. (2004b), aplicaram os mesmos extratos hidro-etanólicos de marcela e de erva mate em lingüiça mantida a 5°C por 35 dias, e verificaram que os extratos apresentaram poder de inibição no crescimento microbiano (contagem de bactérias aeróbias mesófilas, psicrotróficas e coliformes fecais) nesse produto.

Lappe (2004) verificou a eficiência de diferentes concentrações de extrato hidroalcolico de própolis na formação de fungos na superfície do salame tipo italiano e concluiu que a utilização de solução hidroalcolica de própolis em concentrações de 2 e 4% foram eficientes no controle da formação de mofos e não influenciaram significativamente nas características físico-químicas e sensoriais do salame tipo italiano.

Souza (2006) verificou a ação antioxidante dos extratos aquoso e purificado obtidos da casca da batata inglesa em cortes de frango. Durante 8 meses sob temperatura de congelamento os extratos demonstraram ser efetivos no controle da oxidação lipídica. A qualidade sensorial do produto não foi afetada pela incorporação do extrato purificado, mas houve redução nos valores dos atributos sensoriais (sabor da carne) quando do uso do extrato aquoso.

Padilha (2007), verificou a atividade e efeito na qualidade da carne quando da adição de extrato de erva mate (*Ilex paraguariensis*) na dieta de frangos de corte. A utilização do antioxidante natural proporcionou uma diminuição na velocidade da oxidação lipídica durante o período de armazenamento e refrigeração dos cortes de frango, além de diminuir o colesterol na carne de frango, efeito este mais efetivo para os cortes de peito de frango analisados.

Souza e Terra (2008), verificaram a atividade antioxidante dos extratos aquoso e purificado de semente de gergelim quando submetidos ao teste de oxidação acelerada em banha e seu efeito na oxidação lipídica quando aplicados em coxas de frango salgadas, mantidas por 8 meses a -18°C e por 1 mês a 5°C . O extrato purificado de semente de gergelim apresentou a maior atividade antioxidante e também a maior quantidade de fenólicos em relação ao extrato aquoso. A adição dos extratos aquoso e purificado de semente de gergelim nas coxas de frango salgadas inibiu e controlou significativamente a oxidação lipídica em todas as coxas de frango examinadas. O extrato purificado foi significativamente mais efetivo na redução da oxidação lipídica quando comparado ao extrato aquoso. Ambos não interferiram na qualidade sensorial das coxas de frango.

Descalzo e Sancho (2008) revisaram as implicações da incorporação de antioxidantes naturais em carne bovina fresca (músculos), através da dieta dos animais e encontrou haver benefícios nas amostras de pasto, tipicamente contendo maiores níveis de α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico e glutathione em relação as amostras de ração. A suplementação de antioxidantes tem se mostrado efetiva na redução da oxidação lipídica, no desenvolvimento da cor da carne e na conseqüente obtenção de produtos cárneos com vida de prateleira maior.

3.5 Compostos Fenólicos e Flavonóides

Os compostos fenólicos compõem uma classe de substâncias ampla e naturalmente presentes na natureza e abrangem um grande grupo de flavonóides, presentes em vegetais, frutas, vinho, chá (SUN et al., 2002; ZHONG et al., 2004). Tais compostos contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muitos desses economicamente importantes pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas (SUN et al., 2002).

Essas substâncias caracterizam-se pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligada diretamente a um anel aromático. O composto mais simples é o fenol (BRAVO, 1998).

Muitos estudos vêm sendo feitos nesses compostos, pois estes podem apresentar propriedades que exercem efeitos benéficos a saúde humana, como efeito anticarcinogênico, antiinflamatório, antioxidante e antiviral.

O efeito protetor exercido por esses alimentos tem sido atribuído a presença de fitoquímicos com ação antioxidante, dentre os quais se destacam os polifenóis (WANG et al., 1996; BRAVO, 1998; MARTINEZ-VALVERDE et al., 2000; KAUR; KAPOOR, 2002).

Os polifenóis, produtos secundários do metabolismo vegetal, constituem um amplo e complexo grupo de fitoquímicos, com mais de 8000 estruturas conhecidas (BRAVO, 1998; MARTINEZ-VALVERDE et al., 2000).

Este diversificado grupo de compostos encontra-se dividido em várias classes, segundo o esqueleto carbônico dos fitoquímicos, dentre as quais se destacam a dos ácidos fenólicos e a dos flavonóides, entre outras.

Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos principais: ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos e cumarinas. O ácido benzóico possui sete átomos de carbono (C6-C1), sendo os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. O ácido cinâmico é formado pelos ácidos hidroxicinâmicos e possuem nove átomos de carbono (C6-C3). As cumarinas são derivadas do ácido cinâmico (SOARES, 2002). A presença do grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ na estrutura do ácido cinâmico aumenta sua capacidade de estabilizar radicais livres, pela provável conjugação da dupla ligação do grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ com as duplas do anel (RICE-EVANS et al., 1996).

O grupo de compostos fenólicos mais importantes em alimentos são os flavonóides. Sua estrutura é o difenil propano (C6-C3-C6) e consistem em dois anéis aromáticos interligados por três carbonos, formando geralmente uma estrutura heterocíclica oxigenada

(BRAVO, 1998). A estrutura química dos flavonóides favorece sua ação antioxidante. De acordo com Rice-Evans et al. (1996), os hidrogênios dos grupos hidroxila adjacente (orto-difenóis) localizados em várias posições dos anéis A, B e C, as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação $-C=O$ de algumas moléculas de flavonóides fornecem a estes compostos alta atividade antioxidante.

A capacidade dos polifenóis vegetais em atuar como antioxidantes nos sistemas biológicos já foi reconhecida nos anos trinta (BENTHSATH et al., 1936), entretanto, o mecanismo antioxidante foi ignorado até pouco tempo.

De acordo com Rice-Evans et al. (1997), a capacidade antioxidante dos polifenóis é devida, principalmente, as suas propriedades redutoras, cuja intensidade da ação antioxidante exibida por estes fitoquímicos é diferenciada, uma vez que depende fundamentalmente do número e posição de hidroxilas presentes na molécula. Tais compostos agem como antioxidantes não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também devido a seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, em especial de ácidos graxos e de óleos (CUVELIER et al., 1992).

Os polifenóis e as catequinas do chá verde são considerados seqüestradores de radicais livres e quelantes de metais, sendo usados como antioxidantes naturais, antibacterianos e agentes antivirais (TANG et al., 2001).

Em se tratando de extração de polifenóis de especiarias, ervas, chás, frutas e outros compostos, é importante considerar a técnica de extração bem como outros fatores, que podem interferir por exemplo na quantidade de flavonóides do extrato. De acordo com Schwarz et al. (2001), em vista das diferenças entre as técnicas de extração, é óbvio que extratos da mesma planta podem variar amplamente em relação ao seu padrão e concentração antioxidante.

Zhishen et al. (1999), em estudos para determinar o conteúdo de flavonóides de amoras encontraram diferenças no resultado destes compostos, de acordo com os diferentes pré-tratamentos utilizados para a extração. Segundo eles, a variação nos resultados se deve ao fato de ocorrer a decomposição dos flavonóides após um longo período de estocagem ou mesmo sob alta temperatura, havendo também a possibilidade de ocorrer uma mudança na matriz do composto, fazendo com que os flavonóides sejam menos extraíveis.

3.5.1 Marcela (*Achyrocline satureioides*)

A marcela (*Achyrocline satureioides*) é uma erva da flora brasileira, também conhecida por macela-do-campo, macelinha, carrapichinho-de-agulha, camomila nacional, etc.

É uma planta medicinal usada na Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil por suas propriedades antiespasmódica, hepatoprotetora e colerética. O alto conteúdo de compostos polifenólicos, na maioria flavonóides, e de diferentes ácidos fenólicos como o cafeico, clorogênico e isoclorogênico nas partes aéreas desta planta tem despertado o interesse pelo estudo das suas propriedades antioxidantes (SIMÕES et al., 1988; FERRARO et al., 1981).

A quercetina é um dos principais flavonóides presentes na marcela e tem sido descrita como capaz de inibir a peroxidação lipídica por capturar espécies reativas de oxigênio e quelar íons metálicos envolvidos na formação dessas espécies reativas de oxigênio (OHSHIMA et al., 1998).

A atividade antioxidante da marcela já foi demonstrada por diversos autores.

Gugliucci e Menini (2003) estudaram a inibição da oxidação do LDL humano por extrato aquoso de marcela, verificando que a produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico foi reduzida em 95% após 3 horas de incubação com o extrato na concentração de 5 µg/ml.

Pesquisas de Desmarchelier et al. (1998) verificaram que tanto o extrato aquoso como o metanólico de marcela reduziu a produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico em homogeneizados de fígado de ratos. O resultado obtido por estes pesquisadores sugere que o extrato de marcela possui significativa capacidade para carrear radicais livres (CAMPAGNOL, 2007).

3.5.2 Erva mate (*Ilex Paraguariensis*)

A *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate, tem sua área de ocorrência natural restrita a 3 países: Brasil, Paraguai e Argentina. No Brasil está dispersa principalmente nos Estados do Paraná (PR), Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS), Mato Grosso do Sul (MS), São Paulo (SP) e Minas Gerais (MG). O RS,

na década de 70, foi o maior produtor brasileiro, respondendo por 50% da produção, sendo que atualmente sua participação fica em torno de 25% (WINGE et al., 1995). Da produção anual de 650.000 toneladas (MACARI; SANTOS, 2000), aproximadamente 80% são consumidos no mercado interno, ficando os 20% restantes para a exportação (ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA-MATE, 1999).

A erva-mate é uma árvore nativa da América do Sul e a maior parte da erva extraída provém de ervais nativos ou adensados, explorados por pequenos produtores, que se reúnem em cooperativas para o processamento ou a comercializam com grandes indústrias produtoras de erva-mate do sul do país (CANTERLE, 2005).

A erva-mate apresenta altas concentrações de ácidos clorogênicos e de flavonóides, que passam para a bebida durante o processo de infusão da erva (BASTOS; TORRES, 2003).

Filip et al., (2000) analisaram a atividade antioxidante de plantas preparadas como mate. Observaram que a *I. paraguariensis* apresentava uma maior atividade antioxidante que as outras *Ilex* spp consumidas na América do Sul, e que a mesma era preservada no mate, o que permitiu especular que o consumo regular desta bebida poderia contribuir para melhorar significativamente as defesas antioxidantes humanas.

Gugliucci e Stahl (1995) e Gugliucci (1996) observaram que extratos de *I. paraguariensis* causaram uma diminuição na oxidação da lipoproteína humana de baixa-densidade (LDL), em ambos sistemas *in vitro* e *in vivo*.

3.5.3 Chá verde (*Camellia Sinensis*)

Estudos realizados demonstram que os polifenóis presentes no chá verde apresentam bioatividades importantes em certas patologias, como diabetes mellitus, cardiopatias, infecções virais, inflamações, doenças degenerativas, câncer e o envelhecimento. Evidências sugerem que a ingestão diária de antioxidantes, principalmente compostos fenólicos, é capaz de retardar o aparecimento destas doenças (HAN et al., 2004).

O chá verde é rico em vitamina K, nutriente essencial para a coagulação sanguínea. Os compostos polifenólicos como as catequinas, epicatequinas, epicatequinas galato, epigalocatequinas, epigalocatequinas galato são flavonóides responsáveis por controlar e prevenir certas doenças e estão presentes em grande quantidade em ambos os chás (ZHONG et al., 2004), verde e preto, a diferença está no processamento (SABU et al., 2002). A técnica

de produção de chá verde preserva os polifenóis naturais que variam numa proporção de 45-90% (NAKACHI et al., 1998; SABU et al., 2002). Wanasundara e Shahidi (1998) encontraram que os polifenóis do chá verde podem ser de até 36% (base seca), de acordo com o clima, estação do ano ou variedade.

As catequinas e outros bioflavonóides exibem atividade antioxidante. Pensa-se que a formação de radicais livres altamente reativos que são eliminados pelos antioxidantes, têm papel importante nos danos ao DNA, que poderão conduzir ao desenvolvimento do câncer (SAFFARI; SADRZADEH, 2004; UESATO et al., 2001).

Wanasundara e Shahidi (1998) reportaram que as catequinas do chá verde têm sido mais efetivas na redução da oxidação lipídica que o α -tocoferol e o BHA.

Muitos trabalhos de pesquisa vêm apontando o chá verde como sendo um importante antioxidante natural, com diversas aplicações, dentre elas em produtos cárneos.

3.5.4 Própolis

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

É conhecida na medicina familiar desde os tempos primórdios e tem atraído muita atenção em anos recentes como sendo um ingrediente na medicina, produtos domésticos e produtos alimentícios, uma vez que possui várias propriedades biológicas incluindo propriedades antimicrobianas, antioxidantes e antiúlceras (BURDOCK, 1998).

A propriedade antimicrobiana da própolis tem sido largamente relatada.

Nagai et al. (2006) relatam que a própolis apresenta um efeito inibitório elevado contra o crescimento microbiano durante a conservação da carne e músculo. Lee et al. (2003) relatam que o extrato etanólico de própolis apresenta ação antimicrobiana contra o *Staphylococcus aureus*.

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

Já Soares (2004) avaliou o efeito da aplicação de diferentes concentrações de soluções hidroalcoólicas de própolis nas características físico-químicas e microbiológicas (bolors e leveduras) de queijo minas padrão e não encontrou diferença estatística significativa para as características analisadas. Apesar disso, os queijos minas padrão tratados com solução hidroalcoólica de própolis estavam visualmente mais limpos que o controle, levando a suposição de que as cepas prejudiciais (que apresentam colônias mais escuras) proliferaram no queijo minas padrão controle, o que não ocorreu com os queijos tratados com própolis, consequência da ação desta sobre algumas cepas que proliferam neste tipo de queijo.

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

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

Mendes da Silva et al. (2006) encontraram uma alta correlação entre a atividade antioxidante e níveis de fenólicos, indicando que os flavonóides desempenham um papel importante na atividade antioxidante de extratos de própolis no Brasil.

Kumagawa et al. (2004) estudando própolis de diferentes regiões geográficas encontraram que a atividade antioxidante dos mesmos apresentava correlação com o conteúdo total de flavonóides no extrato etanólico de própolis. Os fenólicos são considerados como antioxidantes mais abundantes e efetivos na própolis (SCHELLER et al., 1990).

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

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

3.6 Determinação de Compostos Fenólicos

Existe uma variedade de técnicas para a quantificação espectrofotométrica de compostos fenólicos, sendo a mais usada a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu

(ROGINSKY; LISSI, 2005). O reagente consiste de mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstúico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (IKAWA et al., 2003).

3.7 Métodos para Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro*

Por definição, a atividade antioxidante é a capacidade de um composto de inibir a degradação oxidativa, isto é, a peroxidação lipídica (DESCALZO; SANCHO, 2008).

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas. Um dos mais utilizados consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre estável DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), de coloração púrpura que absorve a 515 nm (ROGINSKY; LISSI, 2005). Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde a quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE_{50}), também chamada de concentração inibitória (CI_{50}). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

A técnica de redução do ferro (redução do Fe^{3+}) é frequentemente usada como um indicador de atividade de doação de elétron, o qual é um importante mecanismo de ação de antioxidantes fenólicos e pode ser fortemente correlacionada com outras propriedades antioxidantes (DORMAN et al., 2003). Neste método, a coloração amarela da solução teste muda para várias tonalidades de verde e azul, dependendo do poder de redução de cada

composto. A presença de redutores (antioxidantes) causa a redução do complexo Fe^{3+} /ferrocianeto para a forma ferrosa (Fe^{2+}). Portanto, a medida espectrofotométrica em comprimento de onda de 700 nm pode monitorar a concentração de Fe^{2+} (FERREIRA et al., 2007).

De acordo com Prieto et al. (1999), o método do fosfomolibdênio é rotineiramente utilizado em laboratórios para avaliar a capacidade antioxidante total de extratos de plantas. Esse método baseia-se na redução do Mo(VI) em Mo(V) e subsequente formação do complexo fosfato de Mo(V). Essa determinação espectrofotométrica apresenta absorção máxima a 695 nm.

3.7.1 Paradoxo Polar

Paradoxo polar consiste na suposição de que a oxidação lipídica inicia na interface do sistema utilizado. A oxidação do óleo puro ocorre na interface ar/óleo e a oxidação da emulsão ocorre na interface óleo/água (FRANKEL; MEYER, 2000).

Tal conceito sugere que os antioxidantes podem ter atividades diferentes, de acordo com o meio (aquoso ou emulsão) onde é aplicado. Nos alimentos as emulsões apresentam duas fases: óleo e água. Em sendo a água a fase contínua e o óleo a fase dispersa, a emulsão é do tipo óleo em água e se inverso, a emulsão é do tipo água em óleo. De acordo com a fase, a eficiência do antioxidante pode ser grandemente afetada pela solubilidade e conseqüente distribuição dos compostos.

Frankel et al. (1994) identificaram haver dificuldades na avaliação dos antioxidantes em óleos e emulsões alimentícias devido em partes ao complexo fenômeno interfacial envolvido. Antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos foram avaliados em dois sistemas, óleo e emulsão. Os antioxidantes lipofílicos α -tocoferol e ascorbil palmitato foram mais efetivos no sistema emulsão óleo-em-água, enquanto o contrário ocorreu para os antioxidantes hidrofílicos Trolox e ácido ascórbico. As diferenças observadas na eficiência dos antioxidantes podem ser explicadas por sua afinidade frente às interfaces ar-óleo no sistema óleo e óleo-água nas emulsões.

De acordo com Porter et al. (1989 apud FRANKEL et al., 1994), antioxidantes solúveis em água (antioxidantes polares) tendem a ser mais efetivos em lipídios puros,

enquanto os antioxidantes apolares (solúveis em lipídeos) são mais ativos em substratos polares.

Os antioxidantes hidrofílicos como o Trolox (ácido carboxílico derivado do α -tocoferol), ácido ascórbico e ácidos rosmarínico e carnosico (presentes no alecrim) apresentam maior atividade antioxidante em óleos puros do que os antioxidantes lipofílicos α -tocoferol, ascorbil palmitato e carnosol (HUANG et al., 1996).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Matéria prima

Para a realização desse projeto foi utilizado a erva mate cedida pelo fornecedor Vier Indústria e Comércio do Mate Ltda. (produto produzido em 28.03.2008, lote 088). A marcela foi colhida no dia quinze de abril de 2008, na região de Linha São Paulo, no oeste de Santa Catarina. A partir dessas amostras foram obtidos seus extratos, conforme procedimentos descritos nos itens 4.2.1 e 4.2.2.

O extrato de chá verde (nome comercial GuardianTM Green Tea Extract 20M, lote 4010894945), o extrato de própolis sem álcool e o BHA (Butylated Hydroxyanisole) foram cedidos pelos fornecedores Danisco, PhytoNatus e Kemin, respectivamente. Todos produzidos e vendidos em escala comercial, prontos para serem aplicados na carne.

4.1.2 Equipamentos

Para a concentração dos extratos de marcela e de erva mate foi utilizado o equipamento Rotavapor® QUIMIS, Evaporador Rotativo Q344B2.

Para as análises de absorbância dos extratos utilizou-se um espectrofotômetro modelo 700S, marca FEMTO.

Para as leituras de TBA na carne foi utilizado um espectrofotômetro modelo DR 5000, marca HACCH.

A leitura de cor foi feita utilizando-se um colorímetro modelo CR-10, marca Minolta.

As fotos foram feitas utilizando-se uma máquina digital marca SONY – Cybershot modelo DSC-T300, sendo cada foto feita com resolução de 1,3 MB.

Para a obtenção da CMS foi utilizado um equipamento modelo PDE 2500, marca POSS-MEYN.

4.1.3 Reagentes

O reagente Folin-Ciocalteu, o ácido gálico, a (+)-catequina, o BHA e o radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Demais reagentes e solventes utilizados eram de grau analítico, de diversas procedências.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo do extrato de Marcela

O produto vegetal seco (inflorescências da marcela) foi inicialmente processado em mixer, sendo em seguida homogeneizado com solvente, transferido para um béquer e deixado durante 1 hora à temperatura ambiente. Transcorrido este período, procedeu-se a filtração utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6. A parte sólida foi submetida a mais duas extrações sucessivas, com o objetivo de extrair totalmente o princípio ativo da matéria prima. Os 3 filtrados foram reunidos e concentrados em evaporador rotativo até 7% do volume inicial, obtendo-se assim o extrato bruto, que foi mantido sob refrigeração em frasco de vidro, protegido da luz. Na elaboração do extrato, a relação líquido-sólido foi de 12:1. Na primeira extração, o solvente empregado foi uma mistura de etanol 95% com água destilada (12:1) e nas duas seguintes etanol 95%. A temperatura da água do banho-maria no evaporador foi de 45 a 47°C. Durante todo o processo de homogeneização e descanso, a solução bem como o filtrado foram bem protegidos da luz com o emprego de papel alumínio.

4.2.2 Preparo do extrato de erva mate

Ao produto vegetal seco (erva mate em pó) foi adicionado etanol 95% e água destilada (quantidades = 28 gramas, 112 ml e 28 ml, respectivamente). Essa mistura foi homogeneizada por 40 minutos, ficando em seguida em repouso por 20 minutos. Transcorrido este período procedeu-se a filtração utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6. A parte sólida foi extraída por mais duas vezes com adição de etanol 95% (140 ml em cada extração). Os 3 filtrados foram reunidos e concentrados em evaporador rotativo até o volume final de 25 ml, obtendo-se assim o extrato bruto, que foi mantido sob refrigeração em frasco de vidro, protegido da luz. Na primeira extração o solvente empregado foi uma mistura de etanol 95% com água destilada e nas duas seguintes etanol 95%. A temperatura da água do banho-maria no evaporador foi de 45 a 47°C. Durante todo o processo de homogeneização e descanso, a solução bem como o filtrado foram bem protegidos da luz com emprego de papel alumínio.

4.3 Análises nos extratos

4.3.1 Preparo das soluções estoque dos extratos

As soluções estoque dos extratos foram preparadas da seguinte forma: em balão volumétrico de 50 ml foi dissolvido 2,5 gramas de extrato em uma mistura de água e etanol 95% (proporção 20:80). Em seguida a solução foi filtrada em membrana 0,45 µm, sendo então direcionada para as diluições e subseqüentes análises.

4.3.2 Conteúdo de Fenólicos Totais

Para a determinação de fenólicos totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). Uma alíquota (0,5 mL) da solução do extrato adequadamente diluída foi misturada a 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N (após essa adição

aguardou-se 5 minutos). Adicionou-se 2 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7,5%. Após a incubação a temperatura ambiente (25°C) por 2 horas, a absorbância foi medida a 760 nm em espectrofotômetro e comparada com a curva de calibração de ácido gálico (faixa de 50-200 mg/L): $Y = 0,0097x - 0,00295$, onde Y é a absorbância e x é a concentração; $R^2 = 0,9989$. Os resultados foram expressos como mg equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g). As análises foram realizadas em triplicata e os valores são apresentados como a média (\pm desvio padrão).

4.3.3 Conteúdo de Flavonóides Totais

O conteúdo total de flavonóides foi determinado usando o método colorimétrico descrito por Dewanto et al., (2002). Resumidamente, 0,25 mL da solução do extrato adequadamente diluída foi misturada a 1,25 mL de água deionizada e a 75 μL de nitrito de sódio (NaNO_3) 5%. Após 6 minutos, adicionou-se então 150 μL de tricloreto de alumínio (AlCl_3) 10% e aguardou-se 5 minutos. Adicionou-se então 0,5 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol e 2,5 mL de água deionizada. Após agitação a absorbância foi lida imediatamente a 510 nm em espectrofotômetro e comparada com a curva de calibração de (+)-catequina (faixa de 50-200 mg/L): $Y = 0,0014x - 0,0007$, onde Y é a absorbância e x é a concentração; $R^2 = 0,999$. Os resultados foram expressos como mg equivalente de (+)-catequina por grama de extrato (mg ECAT/g). As análises foram realizadas em triplicata e os valores são apresentados como a média (\pm desvio padrão).

4.3.4 Atividade Antioxidante

4.3.4.1 Capacidade de seqüestro do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH)

A atividade de seqüestro do radical DPPH das amostras dos extratos foi medida de acordo com o procedimento descrito por Brand-Williams et al. (1995), com modificações. Uma alíquota de 0,1 mL da solução do extrato adequadamente diluída foi misturada a 3,9 mL

da solução metanólica de DPPH 0,1 mM. A mistura foi agitada vigorosamente, protegida da luz onde ficou em repouso em temperatura ambiente (25°C) por 90 minutos. O decréscimo da absorbância de cada solução foi então medida espectrofotometricamente a 517 nm. A capacidade de seqüestro de radical DPPH foi calculada de acordo com a equação:

Capacidade de seqüestro de radical DPPH (%) = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, onde A_0 foi a absorbância do controle e A_1 foi a absorbância na presença do extrato.

Os resultados foram plotados em gráfico de inibição versus concentração e os valores de IC₅₀ foram estimados de acordo com a equação da curva baseada em modelo sigmoidal. Ácido gálico, (+)-catequina e BHA foram utilizados como controle positivo. As análises foram realizadas em triplicata e os valores são apresentados como a média (\pm desvio padrão).

4.3.4.2 Poder de redução

A atividade quelante de metais foi determinada de acordo com o método de Oyaizu (1986). Uma alíquota de 1 mL da solução do extrato adequadamente diluída foi misturada a 2,5 mL de solução tampão fosfato (200 mM, pH 6,6) e 2,5 mL de solução de ferricianeto de potássio 1%. A mistura foi então incubada a 50°C durante 20 minutos. Um volume de 2,5 mL de solução aquosa de ácido tricloroacético (TCA) 10% foi adicionado a mistura, sendo esta centrifugada a 2000 g por 10 minutos a 20°C. 2,5 mL do sobrenadante foi misturado a 2,5 mL de água deionizada e 0,5 mL de solução de cloreto férrico (FeCl₃) 0,1%. A absorbância da solução foi medida espectrofotometricamente a 700 nm e os resultados comparados contra o branco. Um gráfico de absorbância versus concentração foi elaborado e os valores de EC₅₀ (concentração efetiva, concentração que apresenta absorbância igual a 0,5) foi estimada de acordo com a equação da curva baseada em modelo sigmoidal. Ácido gálico, (+)-catequina e BHA foram utilizados como controle positivo. As análises foram feitas em triplicata e os valores são apresentados como a média (\pm desvio padrão).

4.3.4.3 Capacidade Antioxidante Total (Método do Fosfomolibdênio)

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com o método de Prieto et al. (1999). Uma alíquota de 0,1 mL da solução do extrato adequadamente diluída foi misturada a 1 mL de solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). Os tubos foram incubados a 95°C durante 90 minutos. As amostras ficaram em temperatura ambiente até resfriar, sendo então a absorbância de cada solução lida em espectrofotômetro a 695 nm. Os resultados foram comparados com a curva de calibração do ácido gálico (faixa de 2,5-20 mg/L): $Y = 0,0465x - 0,1546$, onde Y é a absorbância e x é a concentração; $R^2 = 0,98$. Os resultados foram expressos como μmol equivalente de ácido gálico por grama de extrato ($\mu\text{mol EAG/g}$). As análises foram feitas em triplicata e os valores são apresentados como a média (\pm desvio padrão).

4.4 Delineamento experimental

4.4.1 Aplicação dos extratos naturais e do antioxidante sintético na CMS

A matéria prima utilizada para a produção da CMS desse projeto consistiu em dorso de frango sem anca+porção frontal/peitoral+pescoço sem pele (figura 11).

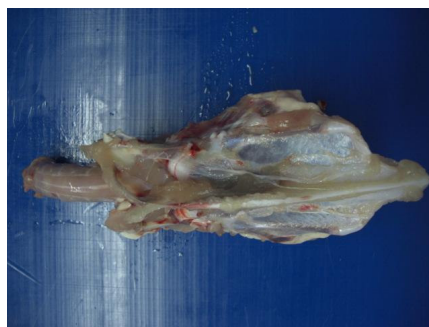


Figura 11: Matéria prima utilizada para a extração da CMS: dorso de frango sem anca+porção frontal/peitoral+pescoço sem pele (Fonte: o autor).

As amostras de carne mecanicamente separada (CMS) foram coletadas em um abatedouro frigorífico, sendo estas de um mesmo lote, provenientes de frango da linhagem ROSS, abatidos com 31 dias.

A aplicação dos extratos naturais e do antioxidante BHA foi feita imediatamente após a coleta da CMS na linha de produção, sendo os tratamentos conforme segue:

Controle negativo = sem adição de antioxidante/extrato;

Extrato de Erva mate = 0,50%;

Extrato de Marcela = 0,50%;

Mistura dos extratos de Erva mate (50%) + Marcela (50%) = 0,50%;

Extrato de Chá verde = 0,05%;

Extrato de Própolis sem álcool = 0,10%;

Controle positivo (antioxidante sintético BHA) = 0,02%,

Cada extrato foi adicionado separadamente a uma porção distinta de 3,60 kg de CMS de frango e homogeneizado. Cada porção foi dividida em seis partes iguais (seis unidades experimentais por tratamento), que foram embaladas em saco de polietileno pigmentado azul sem vácuo. Parte das amostras foi direcionada imediatamente para as análises físico-químicas, microbiológicas, cor e fotos (dia “zero”) e o restante foi armazenada em câmara com controle de temperatura, onde ficou armazenada sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias. A cada dois dias foi recolhida uma unidade experimental de cada tratamento e submetidas as mesmas análises realizadas no dia “zero”.

Os percentuais de aplicação dos antioxidantes utilizados neste trabalho foram definidos da seguinte forma:

- extratos de erva mate, marcela e da mistura: definidos de acordo com o histórico de projetos trabalhados pelo Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos da UFSM, e que revelaram ser 0,50% a aplicação ideal desses extratos em carnes e produtos cárneos (Terra et al., 2003). Valores acima ou abaixo deste trazem perdas no resultado final.
- Extrato de própolis sem álcool: definido de acordo com know-how da equipe orientadora, que afirmou ser esse percentual o melhor para aplicação em carnes e produtos cárneos e que o extrato de própolis sem álcool é o que melhor se homogeneiza na carne.

- Extrato de chá verde: orientação do fabricante.
- Antioxidante sintético BHA: de acordo com know-how da equipe orientadora.

4.5 Análises Físico-Químicas na Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Frango

4.5.1 Determinação do pH (Potencial hidrogeniônico)

A análise do valor do pH foi feita utilizando-se um pHmetro eletrônico (marca Mettler-Toledo 345) calibrado. O eletrodo foi inserido diretamente na carne previamente moída e homogeneizada. Foram analisadas separadamente três sub-amostras de cada unidade experimental.

4.5.2 Determinação do Índice de Peróxido

Para esta análise utilizou-se como referência o método descrito em BRASIL (1999). Pesou-se 15g de amostra de carne, previamente moída e homogeneizada, em erlenmeyer. Adicionou-se 25 mL de clorofórmio, 50 mL de metanol, aproximadamente 13 mL de água destilada e agitou-se por 30 minutos para extração da gordura. Posteriormente adicionou-se 25 mL de clorofórmio e 25 mL de uma solução de sulfato de sódio 1,5% e agitou-se novamente por 2 minutos. Após a agitação, filtrou-se utilizando papel filtro qualitativo para erlenmeyer. O filtrado foi transferido então para funil de separação com auxílio de clorofórmio, para separação das fases e extração da camada etérea, que quando retirada passou por um papel filtro contendo sulfato de sódio anidro para remoção de possíveis traços de água. Retirou-se então uma alíquota de 20 mL e adicionou-se 30 mL de ácido acético glacial e 0,5 mL de uma solução de iodeto de potássio saturada. O erlenmeyer foi fechado ermeticamente e ficou em repouso por 1 minuto. Adicionou-se então 30 mL de água destilada e 1 mL da solução indicadora de amido. O indicador da presença de peróxido é a formação de uma coloração escura. Não havendo essa formação de coloração escura considera-se o resultado como negativo. Foram analisadas separadamente três sub-amostras de cada unidade experimental.

4.5.3 Índice de TBARS

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) resultantes da oxidação lipídica foram determinadas segundo o método de Raharjo et al. (1992), com modificações. Pesou-se 10g de amostra, previamente moída e homogeneizada em saqueta plástica e adicionou-se então 40 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% e 1 mL do antioxidante sintético butilhidroxitolueno (BHT) 0,15%. Homogeneizou-se em Stomacher por um minuto e filtrou-se, com auxílio de papel filtro qualitativo, para balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume completado com a solução de ácido tricloroacético 5%. Deste balão, retirou-se uma alíquota de 5 mL e transferiu-se para tubo de ensaio, onde foi então adicionado 5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,08M em ácido acético 50%. Os tubos foram incubados em banho-maria fervente por 5 minutos. A leitura foi feita a 531 nm e os resultados comparados contra o branco. Foram analisadas separadamente três sub-amostras de cada unidade experimental.

4.5.4 Análise de Cor

A medida da cor foi realizada utilizando-se o Sistema *Cielab*, através da leitura dos valores de L^* (que representa a porcentagem de luminosidade, variando de preto (0%) a branco (100%)), a^* (que varia de verde ($-a^*$) a vermelho ($+a^*$)) e b^* (que varia de azul ($-b^*$) a amarelo ($+b^*$)). As leituras foram feitas na superfície e na parte interna da carne, para todos os tratamentos e em triplicata para cada região avaliada.

4.5.5 Foto

As fotos foram feitas visando identificar as diferenças de cor na superfície e no interior de cada tratamento. Foi utilizado um fundo azul, uma vez que esse tom permite a melhor percepção das características da cor da carne de frango.

4.5.6 Análise Sensorial

Uma equipe formada por 3 analistas treinados avaliou todas as amostras de CMS de frango nos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10 de estocagem. Foi solicitado a equipe para avaliar o odor das amostras logo após a abertura dos pacotes. Os resultados foram discutidos pelo grupo no momento da análise e um parecer unificado para cada tratamento foi registrado.

4.6 Análises Microbiológicas na Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Frango

Para diluição e enriquecimento foram pesados 25 gramas de cada amostra de carne e misturados em 225 mL de água peptonada e tamponada 1%, homogeneizado durante 1 minuto, obtendo-se assim a primeira diluição. Seguiu-se este enriquecimento de amostra para todas as análises realizadas.

4.6.1 Contagem de *Clostridium perfringens*

Para a contagem de *Clostridium Perfringens* seguiu-se a técnica descrita por AOAC (2002). Resumidamente, após o enriquecimento das amostras e seleção das diluições, 1 mL da diluição foi inoculada em placa de petri. Adicionou-se 10 a 15 mL de ágar triptose-sulfito-cicloserina (TSC) previamente fundido e resfriado a $47\pm 1^{\circ}\text{C}$, misturou-se, aguardou-se solidificar em superfície plana, adicionou-se mais 10 mL do mesmo meio, homogeneizou-se e aguardou-se a solidificação do meio de cultura. Incubou-se imediatamente as placas sem inverter em anaerobiose a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 22 horas. Após o período de incubação, contou-se as placas contendo menos do que 150 colônias. Contou-se todas as colônias negras (caso não tenha colônias negras nas placas o teste se encerra nesta etapa). Havendo colônias suspeitas nas placas, selecionou-se 5 colônias de cada placa para confirmação. Se menos de 5 colônias estiverem presentes na placa, seleciona-se todas as colônias características presentes para confirmação. Para confirmação bioquímica, inoculou-se cada colônia selecionada para tubos contendo caldo Tioglicolato previamente desaerado. Incubou-se a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.

Transferiu-se com pipeta estéril imediatamente após a incubação, 5 gotas do caldo tioglicolato contendo o inóculo para caldo Lactose e Sulfito completo. Incubou-se a $46\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas em banho-maria e procedeu-se a contagem. Os resultados foram expressos em UFC/g ou mL.

4.6.2 Contagem de *Salmonella*

Para a contagem de *Salmonella* seguiu-se a técnica descrita por AOAC (2002). Pesou-se 10 ou 25 gramas ou mL de amostra e transferiu-se para 90 ou 225 mL de água peptonada e tamponada 1%, respectivamente, homogeneizando durante 1 minuto. Incubou-se a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.

Extração do DNA

Primeiramente, foi preparada a solução composta pelo tampão Lysis (frasco 12 mL) e a protease (frasco 400 μL). Para preparar a solução, adicionou-se 150 μL da protease para cada frasco de 12 mL do tampão Lysis. Adicionou-se para cada 200 μL desta solução previamente preparada, 5 μL da amostra enriquecida. Esta mistura foi feita em um tubo plástico e a amostra foi pipetada com ponteira contendo filtro.

Preparo dos tubos para Lise

Colocou-se o número necessário de tubos de reação lise no rack com posicionamento das amostras igual ao da folha guia. Preparou-se o reagente lise adicionado de 150 μL de protease em um frasco de 12 mL de tampão lise e homogenizou-se levemente para não ocorrer a formação de bolhas. Em seguida transferiu-se 200 μL de reagente lise para um rack contendo tubos vazios.

Adição da amostra

Após o preparo dos tubos para lise, foi transferido assepticamente 5 μL da amostra enriquecida para tubos contendo a reação lise correspondente. Levaram-se os tubos para os

blocos de aquecimento a seco observando-se a temperatura e o tempo necessário. Primeira etapa, 37°C por 20 minutos; segunda etapa 95°C por 10 minutos. Após as duas etapas de enriquecimento, o material foi resfriado em um bloco que estava sob temperatura de refrigeração. O mesmo somente foi retirado da geladeira 5 minutos antes de ser utilizado. As amostras permaneceram nesta fase por não menos que 10 minutos. Durante a etapa final do tratamento térmico de extração de amostra, preparou-se o BAX, iniciando o processo de aquecimento do termociclador pelo Run Full Process.

Preparo das amostras nos tubos de PCR

Posicionam-se os tubos de PCR no suporte. Removeram-se as tampas da primeira fila de tubos das amostras lisadas e retiraram 50 µL para hidratar os tabletes de PCR. Colocaram-se novas tampas ópticas nas filas de tubos com o tablete de PCR hidratado com a amostra, e prendeu-se firmemente. Após a completa transferência, removeu-se o suporte e levou-se para o termociclador/detector do sistema BAX previamente preparado. Após a transferência completa a etapa no termociclador foi iniciada imediatamente. Os resultados foram gerados pelo BAX e foram expressos em Presença ou Ausência em 10 ou 25 gramas.

4.6.3 Contagem de Aeróbios Mesófilos Totais

Para a contagem de Aeróbios Mesófilos Totais seguiu-se a técnica descrita por AOAC (2002). Após o enriquecimento, as amostras foram colocadas nas placas de *Petrifilm 3M*® sobre uma superfície plana com as diluições desejadas. As placas foram incubadas na posição horizontal, com o lado transparente para cima, em pilhas de até 20 placas a 36°C por 48 horas. Após as 48 horas procedeu-se a contagem. Contaram-se todas as colônias que cresceram na placa, independente do tamanho e intensidade da cor. Os resultados foram expressos em UFC/g ou mL da amostra.

4.6.4 Contagem de *Staphylococcus aureus*

Para a contagem de *Staphylococcus aureus* seguiu-se a técnica descrita por AOAC (2003). Após o enriquecimento das amostras, as mesmas foram colocadas nas placas de *Petrifilm 3M*® para contagem de *S. aureus* sobre uma superfície plana, com suas requeridas diluições. As placas foram incubadas na posição horizontal, com o lado liso para cima, em pilhas de até 20 placas a 36°C por 24 horas. Após o período de incubação, foram observadas as cores das colônias. Se nenhuma colônia aparecer ou apenas colônias vermelho-violeta aparecerem após o período de incubação, contam-se às colônias vermelho-violeta como *S. aureus*. Se aparecerem outras cores de colônias, além das vermelho-violeta, é utilizado um disco *Petrifilm* onde se levanta o filme superior da placa *Petrifilm 3M*® e coloca o disco reativo no local apropriado, de forma que a aba do disco permaneça para fora dessa área. Incuba-se as placas contendo o disco reativo por mais 1 a 3 horas a 36°C. Após a incubação, contam-se apenas as colônias que apresentarem halo com coloração rosa que confirmam a presença de *S. aureus*. Os resultados foram expressos em UFC/g ou mL da amostra.

4.6.5 Contagem de *E. coli* e de Coliformes Totais

Para a contagem de *E. coli* e Coliformes Totais seguiu-se a técnica descrita por AOAC (2002). Após o enriquecimento das amostras, as mesmas foram colocadas nas placas de *Petrifilm 3M*® para contagem de *E.coli* e Coliformes Totais sobre uma superfície plana, com suas requeridas diluições. As placas foram incubadas na posição horizontal, com o lado liso para cima, em pilhas de até 20 placas a 36°C por 24 horas. Depois do período de incubação, contaram-se as colônias. Colônias azuis e vermelhas azuladas associadas ao gás formado, independente de tamanho ou intensidade de cor, são *E.coli*. As colônias de coliformes totais são vermelhas e estão associadas ao gás formado (dentro do diâmetro de uma colônia). A contagem de coliformes totais consiste da somatória das colônias vermelhas e azuis (*E.coli*) associadas ao gás em 24 horas. Os resultados são expressos em UFC/g ou mL da amostra.

4.6.6 Contagem de Bactérias Lácticas

Para a contagem de Bactérias Lácticas seguiu-se a técnica descrita por AOAC (2002). Selecionaram-se as diluições apropriadas da amostra e inoculou-se 1 mL de cada diluição em placa de petri estéreis e vazias. Verteu-se nas placas inoculadas 12 a 15 mL de meio agar MRS previamente fundido e resfriado a $47\pm 1^{\circ}\text{C}$. Misturou-se o inóculo com o meio de cultura movimentando suavemente as placas. Deixou-se solidificar e após adicionou-se uma segunda camada do meio. Deixou-se solidificar novamente e incubou-se as placas sem inverter a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. Contaram-se as colônias características e expressou-se os resultados em UFC/g ou mL. Para a prova da catalase: retirou-se uma colônia da placa e transferiu-se para uma lâmina ou placa de petri contendo uma gota de peróxido de hidrogênio 3%. Nessa prova, a formação ou não formação de borbulhas indicam, respectivamente, prova positiva e negativa para catalase. Bactérias Ácido-Lácticas são catalase negativo.

4.7 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada usando o sistema SAS (Statistical Analysis System) versão 6.0 para Microsoft Windows, 2002. Foi usado o procedimento GLM com teste múltiplo de RYAN-EINOT-GABRIEL-WELSCH (REGWQ). As diferenças foram consideradas significativas com valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fenólicos e Flavonóides

Os resultados do conteúdo de Fenólicos Totais e de Flavonóides nos extratos estão apresentados na tabela 4 e nos gráficos 1 e 2.

Tabela 04 - Conteúdo de compostos Fenólicos Totais e Flavonóides nos extratos de erva mate, marcela, da mistura de extratos de erva mate e marcela, do extrato de chá verde e do extrato de própolis sem álcool ¹

Extrato	Fenólicos totais mg eq. ácido gálico/g extrato	Flavonóides totais mg eq. (+)-catequina/g extrato
Chá verde	230,19 ± 5,97 ^a	58,37 ± 2,29 ^b
Erva mate	81,36 ± 3,18 ^b	68,47 ± 6,11 ^a
Mistura ²	57,08 ± 2,56 ^c	42,85 ± 3,80 ^c
Marcela	31,36 ± 1,11 ^d	12,69 ± 0,51 ^d
Própolis	8,04 ± 0,21 ^e	3,69 ± 0,17 ^e

¹ Valores apresentados como média ± desvio padrão ($n = 3$)

² Mistura dos extratos de erva mate e de marcela.

^{a-e} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo procedimento GLM REGWQ

A importância de se avaliar o teor de compostos fenólicos nos extratos está no fato desse grupo de compostos predominar em plantas e atuar como antioxidantes primários captadores de radicais livres.

A quantidade de componentes extraídos de cada amostra variou consideravelmente. A tabela 4 mostra que existe diferença ($p < 0,05$) entre todos os extratos, tanto para o conteúdo de fenólicos como para flavonóides. O extrato comercial de chá verde teve maior conteúdo de fenólicos totais em relação aos demais extratos naturais utilizados nesse projeto, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a todos eles. O valor obtido (230,19±5,97 mg eq. ácido gálico/g extrato) foi quase três vezes maior que o segundo colocado, o extrato de erva mate (81,36±3,18 mg eq. ácido gálico/g extrato). O menor conteúdo de fenólicos foi encontrado para o extrato de própolis sem álcool (8,04±0,21 mg eq. ácido gálico/g extrato).

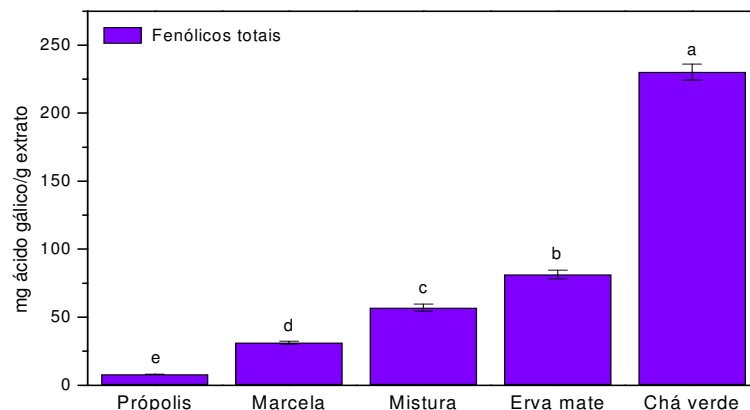


Gráfico 01 - Resultados do conteúdo de Fenólicos Totais (mg eq. ácido gálico/g extrato) dos extratos de erva mate, marcela, da mistura dos extratos de erva mate e marcela, do extrato de chá verde e do extrato de própolis sem álcool

A erva mate apresentou maior teor de flavonóides, diferenciando-se significativamente ($p < 0,05$) de todos os outros extratos empregados neste estudo (tabela 04).

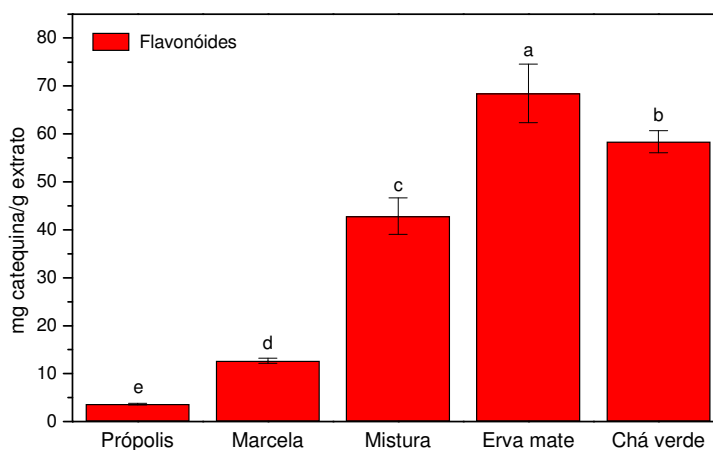


Gráfico 02 - Resultados do conteúdo de Flavonóides (mg eq. (+)-catequina/g extrato) dos extratos de erva mate, marcela, da mistura dos extratos de erva mate e marcela, do extrato de chá verde e do extrato de própolis sem álcool

De acordo com Campos et al. (1996), a erva mate é rica em polifenólicos hidrossolúveis, como os ácidos isoclorogênicos, caféico e clorogênico. A obtenção dos

extratos de erva mate e de marcela foi feita utilizando-se solvente hidroetanólico. Uma vez que os solventes têm diferentes polaridades, ou seja, meio aquoso e meio etanólico possibilitam a extração de compostos mais polares e de polaridade intermediária, respectivamente, pode-se dizer que o resultado obtido para a erva mate indica a presença de compostos fenólicos com polaridades nessas condições.

Asolini et al. (2006) avaliaram o conteúdo de compostos fenólicos de diversas ervas utilizadas como chás, como a arruda (*Ruta graveolens*), a camomila (*Matricaria chamomilla*), a marcela (*Achyrocline satureioides*), a alcachofra (*Cynara scolymus*), a erva mate (*Ilex paraguariensis*), a tanchagem (*Plantago major*), a malva (*Malva silvestris*), a sálvia (*Salvia officinalis*), o capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), através de extratos aquosos e etanólicos dessas plantas. Os resultados mostraram que o extrato aquoso de erva mate teve a maior quantidade de compostos fenólicos (145 mg eq. ác. gálico/g folha seca) entre todas as ervas avaliadas. O extrato etanólico de erva mate teve a segunda maior quantidade de compostos fenólicos (algo em torno de 55 mg eq. ác. gálico/g folha seca, ao passo que a tanchagem apresentou 56 mg eq. ác. gálico/g folha seca). Os extratos aquoso e etanólico de marcela apresentaram resultados em torno de 32 e 42 mg eq. ác. gálico/g folha seca). Estes autores demonstram que a extração aquosa foi aquela que permitiu a maior extração de compostos fenólicos da erva mate. Apesar das condições de preparo das plantas e do processo de extração utilizados neste trabalho serem diferentes do que foi apresentado por Asolini et al. (2006), o extrato hidro-etanólico de erva mate também apresentou o segundo maior conteúdo de fenólicos totais (81,36±3,18 mg eq. ácido gálico/g extrato) (tabela 04).

O fato de haver diferenças nas metodologias utilizadas para elaboração dos extratos dificultam sobremaneira a comparação de resultados. Pesquisas apontam que uma série de fatores podem interferir no conteúdo de compostos fenólicos dos extratos, entre eles as condições de crescimento da planta, do solo, da preparação da planta para a extração, do processo de extração e da metodologia *in vitro* utilizada para identificar o conteúdo desses compostos (MADSEN; BERTELSEN, 1995).

A mistura de extratos de erva mate e marcela (1:1) apresentou o terceiro maior valor de fenólicos totais (57,08±2,56 mg eq. ácido gálico/g extrato) e de flavonóides (42,85±3,80 mg eq. (+)-catequina/g extrato), devido ao efeito positivo do extrato de erva mate na composição da mistura. O menor conteúdo de flavonóides foi encontrado no extrato de própolis sem álcool (3,69±0,17 mg eq. (+)-catequina/g extrato) (tabela 04).

De acordo com Kahkonen et al. (1999), altas quantidades de fenóis não necessariamente significam ou se traduzem em alta atividade antioxidante. Os resultados

encontrados neste trabalho para as análises *in vitro* feitas nos extratos demonstram o contrário, pois os extratos com maior conteúdo de fenólicos (tabela 04) apresentaram sempre a maior atividade antioxidante (tabela 05).

5.2 Atividade Antioxidante

Os resultados obtidos para a atividade antioxidante estão apresentados na tabela 5 e nos gráficos 3, 4, 5, 6 e 7.

A ação de seqüestrar radicais livres é considerada um dos vários mecanismos de antioxidação (SINI; DEVI, 2004). A atividade anti-radical foi verificada testando a habilidade dos extratos em seqüestrar o radical estável DPPH. Esse método é fundamentado na redução da solução alcoólica de DPPH na presença do antioxidante doador de hidrogênio (AH) pela formação da forma não-radicalar DPPH-H, pela reação: $DPPH + AH \rightarrow DPPH-H + A$. O DPPH restante medido após um certo tempo corresponde inversamente a atividade de seqüestro do radical do antioxidante (KOLEVA et al., 2002).

Tabela 05 - Valores médios de IC₅₀ (DPPH), EC₅₀ (Poder de Redução) e Capacidade Antioxidante Total (Método Fosfomolibdênio) dos extratos de erva mate, marcela, da mistura dos extratos de erva mate e marcela, do extrato de chá verde, do extrato de própolis sem álcool e dos padrões¹

Amostra	IC ₅₀ DPPH mg/ml	EC ₅₀ Poder de redução mg/ml	Capacidade antioxidante total µmol ác. gálico/ g extrato
Própolis	>10	>10	3,50 ± 0,54 ^d
Marcela	5,26 ± 0,02 ^a	2,04 ± 0,06 ^a	9,17 ± 0,17 ^d
Mistura	1,90 ± 0,07 ^b	1,07 ± 0,01 ^b	26,08 ± 1,70 ^c
Erva mate	1,32 ± 0,04 ^c	0,67 ± 0,02 ^c	47,90 ± 0,79 ^b
Chá verde	0,34 ± 0,00 ^d	0,26 ± 0,08 ^d	182,52 ± 16,19 ^a
BHA	0,0149 ± 0,0002 ^e	0,0070 ± 0,0005 ^e	-
(+)-Catequina	0,0107 ± 0,0006 ^f	0,0057 ± 0,0001 ^f	-
Ácido gálico	0,0060 ± 0,0002 ^g	0,0028 ± 0,0000 ^g	-

¹ Valores apresentados como média ± desvio padrão (n = 3)

^{a-d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p < 0,05) pelo procedimento GLM REGWQ

De acordo com a definição de Sousa et al. (2007), quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será seu IC_{50} e conseqüentemente maior a sua atividade antioxidante. Portanto, os resultados obtidos para a atividade antioxidante utilizando-se o método do DPPH mostram que, de todos os extratos avaliados, o extrato de chá verde foi o que apresentou maior atividade antioxidante, o que está de acordo com o reportado por Tang et al. (2002), que verificaram que as catequinas do chá verde apresentaram maior poder de seqüestro do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) em concentrações de 200 a 600 ppm (200 a 600 mg/kg).

O segundo extrato mais potente foi a erva mate, seguida pela mistura de erva mate e marcela, da marcela e finalmente da própolis sem álcool, com menor atividade antioxidante deste grupo (tabela 05). Todos os extratos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si.

Bixby et al. (2005) avaliaram a atividade antioxidante de vinhos e extratos aquosos de marcela, chá verde, chá preto e erva mate verde e encontraram os melhores resultados para o extrato de erva mate verde. Segundo estes autores o extrato aquoso de erva mate verde atua como um potente captador de radicais livres. Carini et al. (1998) identificaram que a capacidade de captar o radical livre DPPH pela erva mate está na sua habilidade de transferir o hidrogênio para este radical livre estável, e que sua atividade antioxidante é igual ou superior ao ácido clorogênico puro, ao ácido ascórbico e a vitamina E.

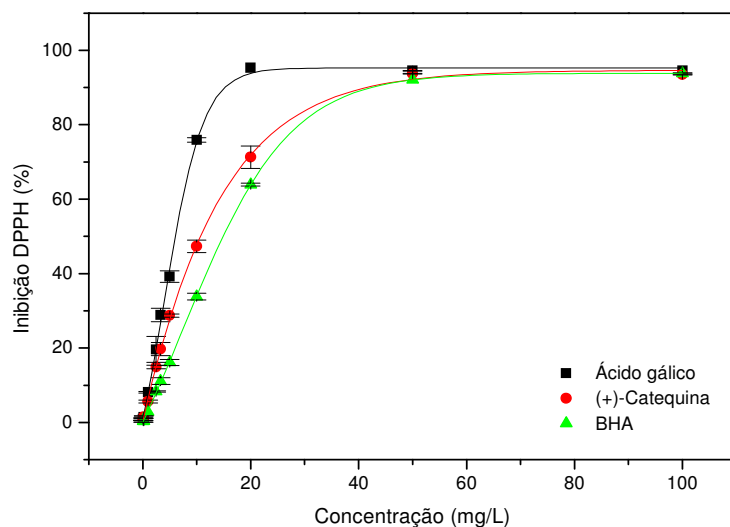


Gráfico 03 - Atividade Antioxidante dos padrões ácido gálico, (+)-catequina e BHA pelo método de Capacidade de seqüestro do radical DPPH

O ácido gálico apresenta atividade antioxidante maior do que a catequina (flavonóide) (tabela 05), que contém cinco grupos hidroxilas em sua estrutura (RICE-EVANS et al., 1996).

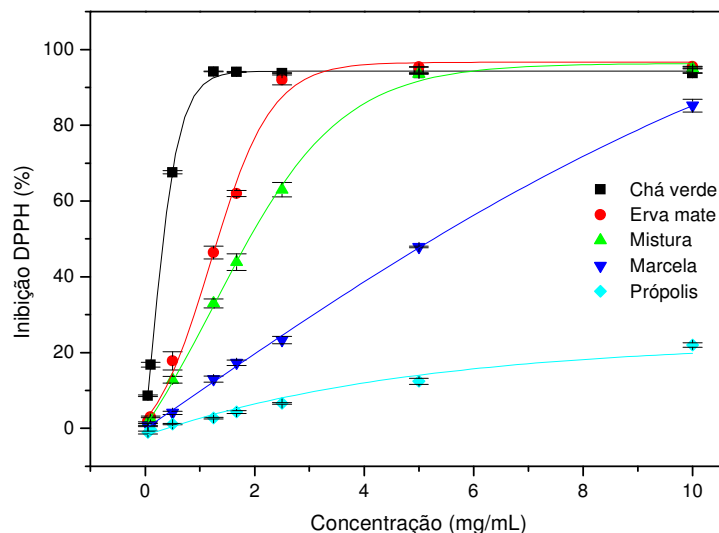


Gráfico 4: Atividade Antioxidante dos extratos de erva mate, marcela, da mistura dos extratos de erva mate e marcela, do extrato de chá verde e do extrato de própolis sem álcool pelo método de Capacidade de seqüestro do radical DPPH

A técnica do poder de redução define que o EC_{50} é a concentração do extrato que resultou em 0,5 de absorvância. Portanto, de forma análoga aos resultados obtidos pelo método do DPPH, o extrato de chá verde apresentou novamente maior poder de redução, seguido na mesma ordem obtida pelo método do DPPH, pela erva mate, pela mistura de erva mate e marcela, pela marcela e por último, pelo própolis sem álcool, com menor poder de redução (tabela 05). Todos os extratos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si (tabela 05).

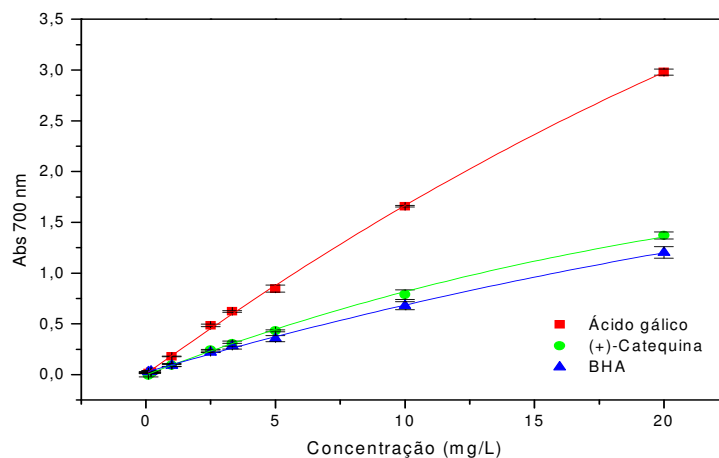


Gráfico 05 - Atividade Antioxidante dos padrões ácido gálico, (+)-catequina e BHA pelo método do Poder de redução

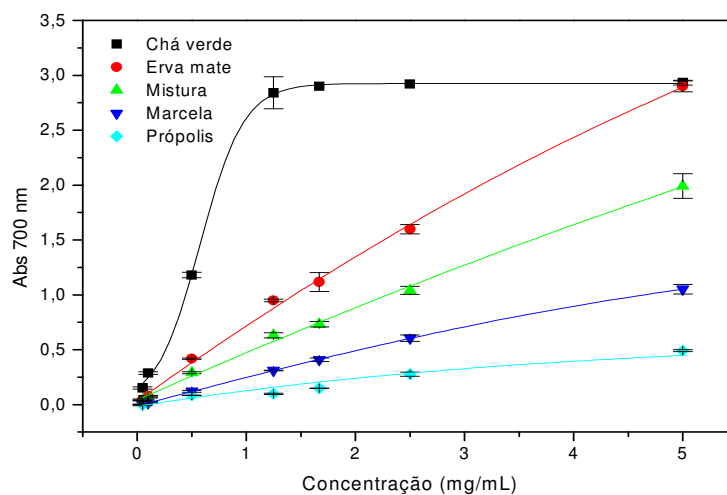


Gráfico 06: Atividade Antioxidante dos extratos de erva mate, marcela, da mistura dos extratos de erva mate e marcela, do extrato de chá verde e do extrato de própolis sem álcool pelo método do Poder de redução

Os resultados obtidos com o método de capacidade antioxidante total estão de acordo com os resultados dos outros dois métodos. Da mesma forma, o extrato de chá verde foi o que apresentou maior capacidade antioxidante total, diferente significativamente ($p < 0,05$) em relação a todos os outros extratos (tabela 05). O extrato de erva mate, da mistura de erva mate e marcela, da marcela e do própolis sem álcool vêm na seqüência e nessa ordem, sendo que o extrato de marcela não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao extrato de

própolis (tabela 05). O bom resultado obtido para a mistura de extratos de erva mate e marcela deve-se ao efeito positivo do extrato de erva mate na composição.

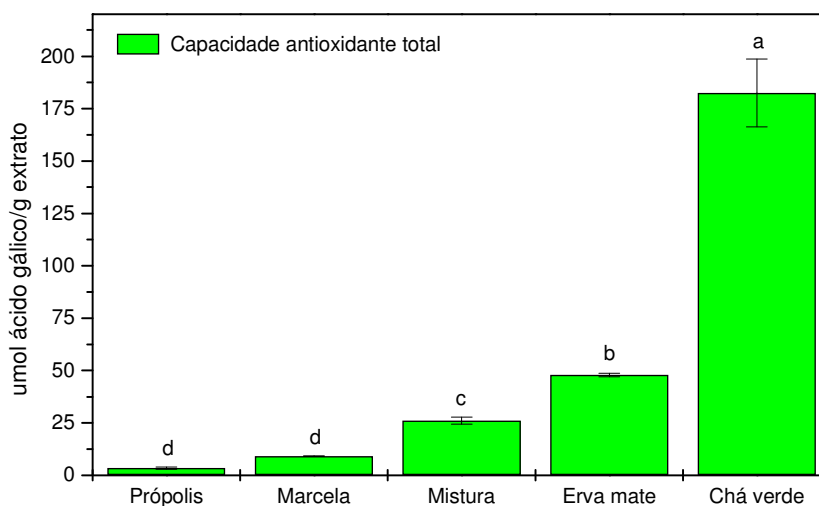


Gráfico 07- Capacidade Antioxidante Total (umol ácido gálico/g extrato) dos extratos de erva mate, marcela, da mistura dos extratos de erva mate e marcela, do extrato de chá verde e do extrato de própolis sem álcool pelo método do Fosfomolibdênio

De acordo com Shahidi et al. (1992), antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais livres e como quelantes de metais, apresentando ação tanto na etapa de iniciação quanto na etapa de propagação durante o processo oxidativo. Então, compostos fenólicos podem prevenir a oxidação lipídica.

A validação de métodos analíticos para a determinação da atividade antioxidante de extratos, juntamente com o desenvolvimento de procedimentos de extração eficientes são importantes ferramentas para o ótimo uso de antioxidantes provenientes de fontes naturais em diferentes tipos de alimentos. A análise da atividade antioxidante é importante pois auxilia na seleção dos extratos antioxidantes que podem ser usados em alimentos por serem efetivos (SCHWARZ et al., 2001).

5.3 pH

Os resultados obtidos para o pH estão apresentados nas tabelas 6 e 7 e no gráfico 8.

O pH da CMS é uma variável que depende de vários fatores, dentre os quais o estado de conservação da carne bem como de suas condições microbiológicas.

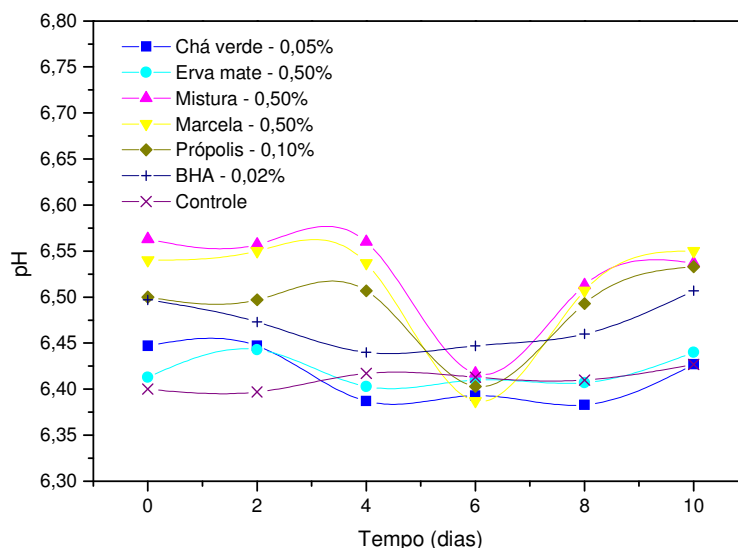


Gráfico 08 – Valores médios de pH da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango sem adição de antioxidantes (controle negativo) e adicionada de extrato de erva mate (0,50%), extrato de marcela (0,50%), da mistura dos extratos de erva mate e marcela (0,50%), do extrato de própolis sem álcool (0,10%), do extrato de chá verde (0,05%) e do antioxidante sintético BHA (0,02%), mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.

Os valores médios de pH obtidos ficaram próximos de 6,4 a 6,5 nos diferentes tratamentos utilizados. Estes resultados ficaram próximos aos valores encontrados por Trindade et al. (2008), que variaram de 6,4 a 6,6 nos diferentes tratamentos com carne mecanicamente separada (CMS) de matriz pesada de corte e de poedeira comercial branca, ambos controles negativos, que foram estocadas durante 99 dias a -18°C, enquanto que Pollonio (1994) encontrou valores de pH de 6,20 a 6,37 para carne mecanicamente separada (CMS) de frango, controle negativo, estocada durante 6 meses.

As CMS apresentam normalmente valores de pH mais elevados, na faixa de 6,50 a 7,00, conseqüência da relação carne-osso da matéria prima utilizada e da incorporação da

medula óssea durante o processo de desossa mecânica (BERAQUET, 2000). Os valores de pH da medula óssea são altos e variam de 6,80 a 7,40 (FIELD, 1988). Grunden et al. (1972) encontraram valores de pH de 6,20 e 6,60 para CMS proveniente de galinha poedeira e de dorso com pescoço de frango, respectivamente.

O comportamento do pH neste trabalho foi similar ao encontrado por Xavier e Beraquet (1994) em termos de estabilidade durante a estocagem, onde CMS de frango provenientes de dorso com caixa torácica adicionadas da mistura de 0,01% de BHA+BHT e 0,01% de nitrito e armazenadas durante 10 dias sob refrigeração de 0 a +2°C apresentaram, juntamente com o controle negativo, valores de pH de 6,65 a 6,75.

Os valores médios de pH encontrados para o tratamento com mistura dos extratos de erva mate e de marcela foram superiores numericamente (6,52) aos demais tratamentos, mas não diferiram significativamente ($p>0,05$) em relação ao segundo maior valor de pH obtido, que ocorreu no tratamento com extrato de marcela (valor médio de 6,51) (tabela 06).

De acordo com Kumar et al. (1986), quanto maior o valor do pH, maior a oxidação lipídica. Os resultados obtidos neste trabalho estão em desacordo com essa afirmação, uma vez que o maior valor de pH ocorreu no tratamento com a mistura de extratos de erva mate e marcela, e esse tratamento apresentou o segundo menor valor médio de TBARS durante a estocagem da carne mecanicamente separada (CMS) de frango.

Na tabela 6, observa-se que os valores médios de pH encontrados em todos os tratamentos foram numericamente muito próximos e não apresentaram grandes variações ao longo dos 10 dias de estocagem (os valores variaram de $6,38\pm 0,01$ a $6,56\pm 0,02$).

O tratamento com a mistura de extratos de erva mate e marcela apresentou o maior ($p<0,0001$) valor médio de pH (6,52) em relação ao tratamento controle negativo (tabela 07). Avaliou-se a influência do tempo nos diferentes tratamentos e observou-se não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre o dia zero e o décimo dia de análise (tabela 07).

5.4 Índice de TBARS

Os resultados obtidos para TBARS estão apresentados nas tabelas 6 e 7 e no gráfico 9.

O teste de TBARS quantifica malonaldeído, um dos principais produtos da decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo.

Em relação aos valores médios de TBARS apresentados na tabela 6, observa-se que a aplicação dos extratos naturais proporcionou melhores resultados em relação a estabilidade oxidativa da carne quando comparada ao tratamento controle negativo (sem adição de antioxidantes), apresentando diferença significativa em relação a esse último ($p < 0,05$).

O tratamento com extrato de marcela foi o que apresentou melhor performance, não apresentando diferença ($p > 0,05$) em relação ao tratamento com BHA (controle positivo). O efeito da aplicação do BHA foi notadamente melhor até o oitavo dia, pois apresentou os menores valores médios de TBARS em relação aos outros tratamentos e portanto promoveu maior estabilidade oxidativa da carne nesse período. Porém, no décimo dia apresentou um aumento expressivo no valor médio de TBARS, provavelmente indicando sua perda de atividade a partir desse dia (tabela 06).

Os extratos de marcela (0,034), o antioxidante sintético BHA (0,049), e o tratamento com a mistura de extratos de erva mate e marcela (0,054) apresentaram os menores valores médios do período de monitoramento para TBARS, e não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre si (tabela 06). Os baixos valores médios de TBARS apresentados no tratamento da mistura de ervas devem-se ao efeito positivo da marcela na composição.

A aplicação demonstrou que os extratos naturais que apresentaram baixa atividade antioxidante (tabela 05) *in vitro* proporcionaram os melhores resultados na estabilidade da oxidação lipídica da carne mecanicamente separada de frango (tabela 06) em relação aos extratos naturais que apresentaram alta atividade antioxidante.

Uma vez que os valores das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) representam o conteúdo dos produtos secundários (principalmente aldeídos) formados durante a oxidação lipídica e contribuem para a perda de odores em alimentos (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1998), pode-se dizer que o extrato natural de marcela teve um efeito marcante na redução dos compostos formados pela oxidação lipídica. Seu efeito foi o melhor em relação a todos os outros extratos naturais e em relação ao antioxidante sintético BHA (tabela 06). Segundo esses mesmos autores, antioxidantes naturais podem ser mais eficientes do que antioxidantes sintéticos.

Tabela 06. Valores médios de TBARS e de pH da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias:

Tratamento	Dia de estocagem ¹						Média
	0	2	4	6	8	10	
<i>TBA (mg malonaldeído/Kg CMS)</i>							
Controle	0,093±0,051	0,077±0,025 ^a	0,247±0,015 ^a	0,290±0,053 ^a	0,393±0,025 ^a	0,443±0,035 ^a	0,257 ^a
Própolis	0,043±0,040	0,000±0,000 ^b	0,153±0,025 ^b	0,153±0,025 ^b	0,160±0,010 ^c	0,130±0,000 ^d	0,107 ^c
Marcela	0,000±0,000	0,000±0,000 ^b	0,033±0,006 ^{c,d}	0,053±0,015 ^{c,d}	0,033±0,026 ^c	0,083±0,015 ^d	0,034 ^d
Mistura	0,000±0,000	0,000±0,000 ^b	0,083±0,006 ^c	0,060±0,017 ^{c,d}	0,053±0,015 ^c	0,127±0,012 ^d	0,054 ^d
Erva mate	0,030±0,052	0,003±0,003 ^b	0,263±0,040 ^a	0,250±0,010 ^a	0,247±0,015 ^b	0,257±0,021 ^b	0,175 ^b
Chá verde	0,037±0,015	0,063±0,021 ^a	0,080±0,020 ^c	0,090±0,010 ^c	0,110±0,026 ^d	0,183±0,021 ^c	0,094 ^c
BHA	0,030±0,026	0,047±0,025 ^a	0,010±0,017 ^d	0,013±0,006 ^d	0,016±0,007 ^c	0,177±0,015 ^c	0,049 ^d
<i>pH</i>							
Controle	6,40±0,01 ^c	6,40±0,01 ^c	6,42±0,03 ^{c,d}	6,41±0,01 ^b	6,41±0,02 ^c	6,43±0,05 ^c	6,41 ^d
Própolis	6,50±0,00 ^c	6,50±0,01 ^b	6,51±0,01 ^b	6,40±0,01 ^{b,c,d}	6,49±0,02 ^{a,b}	6,53±0,06 ^a	6,49 ^b
Marcela	6,54±0,01 ^b	6,55±0,01 ^a	6,54±0,01 ^{a,b}	6,39±0,01 ^d	6,51±0,02 ^a	6,55±0,01 ^a	6,51 ^a
Mistura	6,56±0,01 ^a	6,56±0,02 ^a	6,56±0,01 ^a	6,42±0,01 ^b	6,51±0,01 ^a	6,54±0,03 ^a	6,52 ^a
Erva mate	6,41±0,01 ^c	6,44±0,01 ^d	6,40±0,01 ^d	6,41±0,01 ^{b,c}	6,41±0,02 ^c	6,44±0,01 ^{b,c}	6,42 ^d
Chá verde	6,45±0,01 ^d	6,45±0,01 ^d	6,39±0,02 ^d	6,39±0,01 ^d	6,38±0,01 ^c	6,43±0,01 ^c	6,41 ^d
BHA	6,49±0,01 ^c	6,47±0,01 ^c	6,44±0,01 ^c	6,45±0,01 ^a	6,46±0,00 ^b	6,51±0,01 ^{a,b}	6,47 ^c

¹ Valores apresentados como Média ± Desvio padrão (n = 3). ^{a-c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p < 0,05) pelo procedimento GLM REGWQ

Tabela 07 - Efeito de extratos naturais sobre os valores médios de TBARS, de pH e da cor superficial (L^* , a^* , b^*) da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias:

Efeito	TBARS mg MA/Kg CMS	pH	L^*	a^*	b^*
<i>Tratamento</i>					
Controle	0,257 ^a	6,41 ^d	46,28 ^{a,b}	19,79 ^a	16,78 ^a
Própolis	0,107 ^c	6,49 ^b	45,93 ^{a,b}	19,42 ^a	15,45 ^b
Marcela	0,034 ^d	6,51 ^a	46,34 ^{a,b}	16,91 ^c	16,75 ^a
Mistura	0,054 ^d	6,52 ^a	46,14 ^{a,b}	16,03 ^c	16,64 ^a
Erva mate	0,175 ^b	6,42 ^d	45,43 ^b	16,38 ^c	16,89 ^a
Chá verde	0,094 ^c	6,41 ^d	46,17 ^{a,b}	18,64 ^{a,b}	16,63 ^a
BHA	0,049 ^d	6,47 ^c	46,81 ^a	17,41 ^{b,c}	16,26 ^{a,b}
<i>Tempo (dia)</i>					
0	0,033 ^d	6,48 ^a	47,07 ^a	19,86 ^a	15,21 ^c
2	0,027 ^d	6,48 ^a	46,81 ^a	19,37 ^a	16,86 ^{a,b}
4	0,124 ^c	6,46 ^b	46,66 ^a	17,81 ^b	17,31 ^a
6	0,130 ^{b,c}	6,41 ^c	44,97 ^c	17,36 ^{b,c}	16,63 ^{a,b}
8	0,145 ^b	6,45 ^b	46,10 ^{a,b}	16,17 ^c	16,61 ^{a,b}
10	0,200 ^a	6,49 ^a	45,33 ^{b,c}	16,20 ^c	16,29 ^b
<i>Trat.</i>	***	***	*	***	**
<i>Tempo</i>	***	***	***	***	***
<i>Trat.xTempo</i>	***	***	***	***	**

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$

^{a-d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo procedimento GLM REGWQ

Encontrar um antioxidante natural equivalente a um antioxidante sintético é importante para a saúde humana, pois alguns antioxidantes sintéticos têm atividade carcinogênica e seu uso na indústria de alimentos é maior ou mesmo predominante em relação ao uso do antioxidante natural (BOZKURT, 2006).

Segundo Chen et al. (1996), as características de inibição da oxidação dos extratos dependem do número total e da posição dos grupos hidroxilas nos anéis aromáticos. Dependendo do sistema em que será aplicado (aquoso ou emulsão), pode trazer resultados distintos, de acordo com sua hidrofobicidade ou hidrofiliçidade, que podem favorecer ou mesmo atrapalhar a distribuição das quantidades de flavonóides nesses sistemas. Esse conceito pode explicar a performance da aplicação do extrato de própolis sem álcool na CMS de frango, pois mesmo apresentando o menor conteúdo de flavonóides *in vitro* ($3,69 \pm 0,17$ mg eq. (+)-catequina/g extrato - tabela 04), obteve resultados de TBARS melhores que aqueles obtidos com o tratamento com extrato de erva mate (tabela 06).

De forma análoga, a explicação para o excelente resultado na estabilidade oxidativa da CMS de frango quando tratada com extrato de marcela (tabela 06) pode estar nas pesquisas feitas por Frankel et al., (1994), Frankel (1996) e Frankel et al., (1996a). Tais pesquisas giram em torno do chamado paradoxo polar, e sugerem que nos sistemas de emulsão óleo em água, os antioxidantes hidrofóbicos estão situados no óleo e na interface óleo/água, onde exercem mais proteção do que os antioxidantes hidrofílicos. Os antioxidantes hidrofílicos que estão na fase aquosa não conseguem proteger os lipídios na interface óleo/água. Extrapolando esse conceito, o extrato de marcela utilizado neste trabalho pode conter mais constituintes hidrofóbicos que o extrato de erva mate, por exemplo. Os mecanismos dessas reações precisam ser melhor investigados.

Os resultados deste estudo mostram que, de todos os tratamentos com extratos naturais, o que utilizou o extrato de erva mate foi o que apresentou, a partir do quarto dia de estocagem, os maiores valores de TBARS (tabela 06). Apesar dos altos valores de TBARS, esses ainda estão abaixo dos resultados obtidos com o tratamento controle (sem antioxidante) e portanto, não podemos considerar que o extrato de erva mate teve efeito pró-oxidante, mas devemos levar em consideração que os constituintes da clorofila presentes neste extrato podem ter efeito catalítico no sistema cárneo em questão. Tal fato foi apresentado por Wanasundara e Shahidi (1998), que concluíram haver diferenças importantes no comportamento oxidativo de diferentes óleos marinhos tratados com diferentes aplicações de extratos de chá verde com e sem clorofila, sendo que o primeiro apresentou efeito pró-oxidante em ambos os óleos e o extrato declorofilizado (acima de 200 ppm) apresentou

excelente atividade antioxidante, sendo mais efetivo que o BHA, BHT e α -tocoferol, nas mesmas condições.

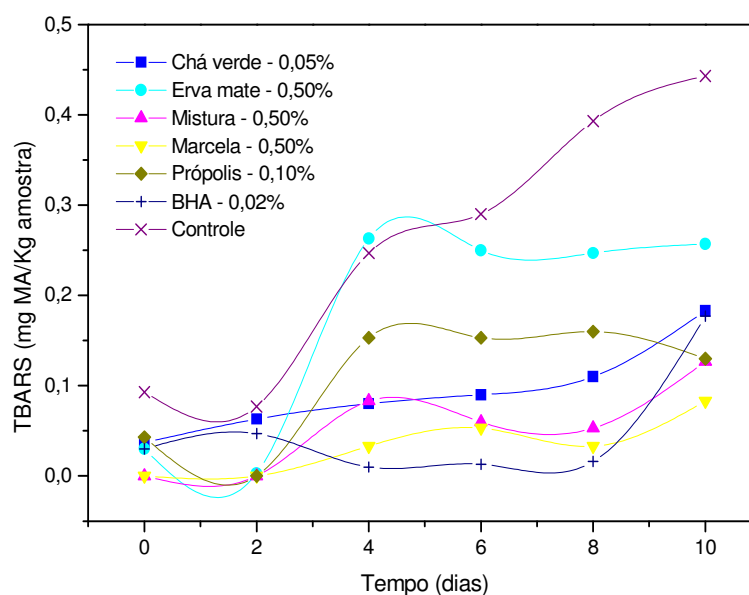


Gráfico 9: Valores médios de TBARS (mg MA/kg) da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango sem adição de antioxidantes (controle negativo) e adicionada de extrato de erva mate (0,50%), extrato de marcela (0,50%), da mistura dos extratos de erva mate e marcela (0,50%), do extrato de própolis sem álcool (0,10%), do extrato de chá verde (0,05%) e do antioxidante sintético BHA (0,02%), mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.

Counsell e Hornig (1981 apud TRINDADE et al., 2008) relataram que odores de ranço podem ser detectados por provadores treinados e não treinados com TBARS na faixa de 0,5 a 1,0 e 0,6 a 2,0 mg malonaldeído / kg de amostra, respectivamente. Todos os resultados de TBARS obtidos em todos os tratamentos neste trabalho estão abaixo desses valores mínimos (0,5 e 0,6 mg malonaldeído / kg de amostra), mas apesar desses baixos valores, ainda assim se percebeu alteração de odor nas amostras, o que está em desacordo com o relatado por estes autores.

No quarto dia de análise identificou-se um suave e pontual odor de ranço na amostra tratada com extrato de erva mate, que se repetiu nos dias de análise subsequentes. O mesmo foi observado para o controle negativo e para os tratamentos com extratos de marcela, da mistura, com própolis sem álcool a partir do sexto dia de estocagem. O tratamento com

própolis apresentou odor extremamente acentuado no décimo dia de análise, característico de produto impróprio para uso.

De acordo com Osawa et al., (2005), em alguns casos o melhor a se fazer é treinar uma equipe de provadores para discriminar alterações sensoriais do produto e aplicar a metodologia de TBARS, correlacionar as notas atribuídas pela equipe com os valores obtidos para TBARS e estabelecer então os parâmetros de qualidade definidos por essa correlação.

Notou-se que no último dia do monitoramento houve uma redução no valor de TBARS encontrado para o tratamento do extrato de própolis sem álcool, o que não ocorreu para os outros tratamentos (tabela 06). Alguns estudos têm demonstrado um aumento nos valores de TBARS até certo ponto durante o período de estocagem, seguido então pela redução desses valores (BABJI et al., 1998). Igene e Pearson (1979) estabeleceram que, durante a avaliação da oxidação lipídica em alimentos estocados, o decréscimo dos valores de TBARS ocorrem provavelmente devido a interações entre o malonaldeído e as proteínas.

O tratamento com extrato de marcela apresentou o menor valor ($p < 0,0001$) de TBARS em CMS de frango quando comparado a todos os demais tratamentos (tabela 07). O extrato de chá verde apresentou o quarto menor valor médio de TBARS, sendo este valor estatisticamente igual ($p > 0,05$) ao obtido pelo tratamento com extrato de própolis sem álcool (tabela 07).

Hassan e Fan (2005) estudaram os efeitos do extrato de chá verde e de diferentes concentrações do extrato das folhas do cacau na estabilidade oxidativa da carne mecanicamente separada de frango cozida e conservada a 4°C durante 4 semanas. Aplicaram também na carne uma mistura dos antioxidantes sintéticos BHA/BHT para melhor comparação dos resultados. O chá verde apresentou durante todo o período de estocagem, valores de TBARS muito próximos aos encontrados para a mistura de BHA/BHT, e esses valores foram bem menores do que os encontrados para o controle negativo (sem antioxidante). Apesar das diferenças entre os modelos cárneos utilizados, neste trabalho o tratamento com extrato de chá verde também apresentou resultados de TBARS bem menores em relação aos encontrados para o controle negativo (sem antioxidante) (tabela 06).

Terra et al. (2000) verificaram os efeitos antioxidantes do extrato de chá preto, extrato de alecrim e do lactato de sódio em carne mecanicamente separada de frango, conservada por 15 dias a 5°C e constataram que todas as amostras apresentaram valores de TBARS inferiores ao controle negativo (sem antioxidante), sendo que o chá preto apresentou a segunda melhor ação antioxidante. Milani et al. (2001) estudaram os efeitos antioxidantes dos extratos alcoólicos e metanólicos do chá verde, chá preto e de erva mate em carne mecanicamente

separada de frango, conservada a 5°C e a -25°C e observaram que todos os extratos demonstraram ação antioxidante quando comparados com a amostra controle (sem antioxidantes). Os resultados encontrados por Terra et al., (2000) e Milani et al., (2001) reforçam o que também foi encontrado nesse trabalho, ou seja, a adição de extratos naturais na CMS favorecem a estabilidade oxidativa dessa carne, identificada pelos baixos valores de TBARS em relação ao controle negativo (sem antioxidante).

Avaliou-se a influência do tempo nos diferentes tratamentos, e observou-se o aumento dos valores de TBARS ao longo do período de estocagem. O resultado do décimo dia de estocagem foi o maior e diferente significativamente ($p < 0,05$) dos demais dias (tabela 07).

5.5 Índice de Peróxido

O índice de peróxido é um método largamente utilizado para determinar os estágios iniciais de oxidação lipídica em CMS. Esse método foi utilizado nesse projeto para todos os tratamentos, o resultado foi o mesmo em todos os dias de análise e igual a zero. Alguns fatores podem ter contribuído para este bom resultado, como o fato dos extratos mostrarem forte proteção contra a oxidação mas também pela qualidade inicial da amostragem da carne, pelas excelentes condições de embalagem e temperatura de estocagem. O resultado obtido está dentro do padrão estabelecido pela Legislação vigente para a Carne Mecanicamente Separada de Ave (BRASIL, 2000a).

5.6 Cor L^* , a^* , b^* e Fotos

Os resultados obtidos para a luminosidade (L^*), cor vermelha (a^*) e cor amarela (b^*) na superfície e na parte interna da carne mecanicamente separada (CMS) de frango estão apresentados nas tabelas 7, 8 e 9, respectivamente. As fotos de cada tratamento ao longo do período de monitoramento são apresentadas nas figuras 12, 13, 14 e 15.

De acordo com o diagrama de Hunter (Pereira, 2002), quanto mais altos forem os valores de L^* (mais próximos de 100) mais pálida será a carne analisada.

Os valores de luminosidade (L^*) na superfície da carne mecanicamente separada (CMS) de frango em todos os tratamentos não variaram muito (tabela 08). A média dos valores de L^* encontrados no período de 10 dias de monitoramento mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos com extrato de erva mate e o antioxidante sintético BHA, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) para os demais extratos, quando comparados entre si (tabela 08). Numericamente, os valores encontrados para todos os tratamentos ficaram muito próximos.

Com seis dias de monitoramento notou-se que no tratamento com extrato de erva mate e no tratamento controle negativo (sem antioxidante) ocorreu redução nos valores de L^* em relação aos outros dias de análise (tabela 08). O mesmo ocorreu para o tratamento com extrato de própolis sem álcool no décimo dia (tabela 08). Teoricamente, essa redução do valor de L^* significa que a carne está mais 'escura'. Quando comparamos os resultados de luminosidade (L^*) encontrados (tabela 08) com as fotos (figuras 12 e 13), observou-se não haver uma correlação entre as informações, uma vez que o tratamento com própolis sem álcool no décimo dia está com coloração extremamente rosada/vermelho púrpura (figura 12) e os tratamentos controle negativo (sem antioxidantes) e o com extrato de erva mate têm sua superfície com coloração bem diferente do tratamento com extrato de própolis sem álcool (coloração marrom-esverdeado) (figura 13).

Apesar de não haver aparente correlação neste caso, de acordo com o proposto por Stewart et al., (1965), se avaliarmos a razão a^*/b^* para esses três tratamentos nas datas de análise mencionadas anteriormente, vamos encontrar que o tratamento com extrato de própolis sem álcool é o que apresenta maior teor de oximioglobina, ou seja, carne de coloração vermelho vivo, o que pode ser observado de forma clara na foto do produto.

Os valores médios de cor vermelha (a^*) analisados na superfície da carne mecanicamente separada ao longo dos 10 dias de estocagem são apresentados na tabela 08. Os valores de a^* para todos os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$) durante os 10 dias de estocagem. Observou-se que no dia zero todos os tratamentos apresentaram valores de a^* numericamente muito próximos, ou seja, uma coloração vermelha mais intensa, mas sem diferença significativa ($p > 0,05$). Nos períodos finais do monitoramento observou-se uma tendência na redução da intensidade da cor vermelha das amostras, exceto para o tratamento com extrato de própolis sem álcool, onde ocorreu o efeito contrário. A oxidação dos pigmentos heme é fator determinante na oxidação lipídica da carne mecanicamente separada de frango, onde a diminuição dos pigmentos heme é altamente

correlacionada com a redução do valor a^* , ou seja, da intensidade da cor vermelha (POLLONIO, 1994).

A média do período mostra não haver diferença significativa para os valores de a^* ($p>0,05$) entre os tratamentos com extrato de marcela, erva mate e da mistura, apresentando valores numericamente muito próximos (tabela 08). Os tratamentos com o BHA e chá verde não diferiram ($p>0,05$) entre si. Da mesma forma, também não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos controle negativo e própolis (tabela 08), o que está em desacordo com o registrado nas fotos para esses dois tratamentos (figura 12). Portanto, a avaliação da cor vermelha a^* pelos resultados médios parece não ser a melhor forma de afirmar ou mesmo de estabelecer diferenças ou não entre os tratamentos, uma vez que divergem do que foi avaliado através do colorímetro e do que foi registrado nas fotos.

A redução do valor de a^* na superfície da carne mecanicamente separada (CMS) de frango no tratamento com chá verde pode ser explicada pelo fato de que as catequinas presentes neste produto causaram descoloração possivelmente pela combinação com o ferro da mioglobina e retardaram a oxidação lipídica, pois reagiram com os radicais livres (MITSUMOTO et al., 2005).

O comportamento encontrado para os valores de L^* na região interna das amostras de carne mecanicamente separada (CMS) de frango (tabela 09) foi similar ao encontrado para os valores de L^* na superfície das amostras (tabela 08), quanto a não apresentar diferença significativa entre os tratamentos durante os 10 dias de estocagem.

Importante notar que os valores de L^* registrados para a parte interna (tabela 09) da carne foram mais elevados que os encontrados na superfície (tabela 08). De forma análoga, o mesmo foi observado nos valores de a^* , também ligeiramente mais altos na parte interna (tabela 09) do que os encontrados na superfície da carne (tabela 08), denotando portanto uma coloração vermelha mais intensa no interior das amostras analisadas (fotos 14 e 15).

Isso pode ser explicado pelo fato da CMS ter apresentado durante o período de estocagem, de forma mais evidente e perceptível visualmente a oxidação na superfície da carne, ao passo que no seu interior esse processo ocorreu de forma mais lenta e as pequenas porções mais claras, identificadas como gordura e/ou membranas predominaram nas amostras, aumentando os valores de L^* na leitura objetiva da cor.

Avaliou-se a influência do tempo nos valores de a^* para os diferentes tratamentos (tabela 07), e observou-se a redução deste parâmetro durante todo o período. A cor vermelha (a^*) da carne mudou, e no oitavo e décimo dias de estocagem foram diferentes ($p<0,05$) da condição inicial obtida no dia zero de análise.

Na literatura encontra-se com mais frequência informações relativas a análise e padrões de cor L^* , a^* , b^* em músculos íntegros e em produtos cárneos industrializados. Não foram encontradas na literatura informações que definam um padrão de cor L^* , a^* , b^* bem como um padrão da razão a^*/b^* em carne mecanicamente separada (CMS) de frango em condições iguais ou similares as utilizadas neste projeto.

Tabela 08 – Valores médios para a Luminosidade (L^*), cor vermelha (a^*) e cor amarela (b^*) na superfície da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias:

Tratamento	Dia de estocagem ¹						Média
	0	2	4	6	8	10	
<i>L* (Luminosidade)</i>							
Controle	46,53±2,03	47,60±0,40	47,17±1,59	42,80±1,93	47,10±1,06	46,50±2,36	46,28 ^{a,b}
Própolis	48,70±0,36	46,13±0,95	45,77±0,61	46,50±0,56	45,57±0,45	42,93±0,51	45,93 ^{a,b}
Marcela	46,23±0,15	49,10±1,44	45,97±0,58	44,73±1,36	46,17±0,38	45,83±0,64	46,34 ^{a,b}
Mistura	46,37±1,16	45,70±2,34	46,37±0,97	46,57±1,50	45,60±0,53	46,23±1,60	46,14 ^{a,b}
Erva mate	46,50±0,53	46,13±1,10	47,37±1,08	41,90±2,16	46,57±1,91	44,10±0,75	45,43 ^b
Chá verde	47,33±0,84	46,60±1,15	46,03±1,55	44,97±0,71	45,40±0,30	46,70±1,68	46,17 ^{a,b}
BHA	47,83±0,80	46,40±0,10	48,00±0,56	47,33±1,20	46,27±0,76	45,03±0,45	46,81 ^a
<i>a* (vermelho)</i>							
Controle	21,50±0,85	21,20±1,85	22,80±1,15	18,27±0,75	19,00±1,81	15,97±2,23	19,79 ^a
Própolis	19,80±0,52	19,67±0,51	18,00±0,75	18,97±2,05	18,67±4,21	21,40±0,96	19,42 ^a
Marcela	19,37±0,59	19,23±0,45	16,50±0,56	17,57±2,19	13,40±0,70	15,37±1,07	16,91 ^c
Mistura	18,97±2,91	16,20±1,67	17,87±1,66	16,00±1,67	13,20±0,89	13,93±0,81	16,03 ^c
Erva mate	19,27±0,35	19,43±1,99	15,90±1,66	16,83±2,02	13,73±2,06	13,13±0,90	16,38 ^c
Chá verde	20,37±0,80	20,40±1,47	16,70±0,62	17,30±1,28	19,87±1,36	17,20±1,04	18,64 ^{a,b}
BHA	19,77±1,34	19,47±1,44	16,90±0,26	16,63±2,41	15,33±2,05	16,37±1,36	17,41 ^{b,c}
<i>b* (amarelo)</i>							
Controle	14,87±1,06	17,23±1,46	18,00±1,81	16,67±0,72	17,37±0,78	16,57±0,35	16,78 ^a
Própolis	15,23±1,21	15,43±2,02	17,43±0,49	16,70±0,56	15,70±0,66	12,20±4,40	15,45 ^b
Marcela	15,70±0,26	15,90±0,10	17,40±0,60	16,40±0,75	17,27±0,23	17,83±1,10	16,75 ^a
Mistura	15,40±0,50	16,80±0,21	18,17±0,71	16,27±1,25	16,10±0,82	17,10±0,92	16,64 ^a
Erva mate	15,97±0,35	18,27±0,49	17,37±0,64	16,47±1,91	16,93±0,67	16,33±0,60	16,89 ^a
Chá verde	14,93±0,15	17,77±1,32	16,53±0,76	16,67±0,93	16,43±1,00	17,43±0,21	16,63 ^a
BHA	14,40±0,60	16,60±0,20	16,30±0,78	17,23±0,76	16,47±1,36	16,57±0,81	16,26 ^{a,b}

¹ Valores apresentados como Média ± Desvio padrão ($n = 3$)

^{a-e} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo procedimento GLM REGWQ

Tabela 09. Valores médios para a Luminosidade (L^*), cor vermelha (a^*) e cor amarela (b^*) na parte interna da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias:

Tratamento	Dia de estocagem ¹						Média
	0	2	4	6	8	10	
<i>L* (Luminosidade)</i>							
Controle	48,37±2,05	47,70±1,21	48,20±1,05	48,77±1,12	47,93±1,55	47,30±0,70	48,04
Própolis	48,90±1,81	47,67±1,43	47,23±1,42	48,50±0,79	48,53±0,68	46,37±2,63	47,87
Marcela	47,80±2,46	46,43±1,83	49,83±0,85	50,47±1,16	49,43±0,74	48,17±0,87	48,69
Mistura	48,73±0,85	48,77±2,27	49,20±0,89	47,53±1,67	48,33±0,84	48,37±1,24	48,49
Erva mate	48,03±1,12	48,87±0,50	47,80±0,53	48,80±2,18	50,10±0,92	47,77±1,10	48,56
Chá verde	48,70±0,30	50,23±1,16	48,30±0,46	48,10±0,66	47,57±0,15	48,77±1,45	48,59
BHA	50,03±0,57	48,57±2,76	47,10±0,78	47,90±1,08	47,47±1,70	48,03±1,20	48,18
<i>a* (vermelho)</i>							
Controle	19,43±1,79	21,63±1,14	22,00±0,35	20,90±0,98	21,57±0,49	19,10±1,76	20,77 ^a
Própolis	17,67±1,44	18,77±0,74	19,87±1,15	17,27±0,49	20,30±2,10	19,57±1,62	18,91 ^b
Marcela	17,03±0,45	18,10±0,60	17,93±0,51	17,73±0,21	16,10±0,92	19,37±1,10	17,71 ^c
Mistura	15,73±1,39	17,37±0,83	17,70±1,32	16,33±2,98	19,20±2,01	18,43±2,40	17,46 ^c
Erva mate	18,07±1,33	19,60±0,50	18,27±1,40	18,40±1,23	17,67±0,15	18,63±1,56	18,44 ^{b,c}
Chá verde	19,90±0,46	19,33±1,29	20,40±0,78	19,33±0,46	19,10±1,11	19,00±2,61	19,51 ^b
BHA	18,67±1,00	19,97±1,12	19,47±1,00	19,17±0,64	18,53±0,83	19,67±1,06	19,24 ^b
<i>b* (amarelo)</i>							
Controle	14,47±1,61	16,47±1,44	16,47±0,40	16,20±0,53	15,80±1,04	17,33±0,35	16,12 ^a
Própolis	13,43±1,68	14,33±0,75	15,30±0,26	14,00±0,30	15,93±1,80	15,27±1,46	14,71 ^c
Marcela	14,50±0,66	16,77±1,89	16,13±0,32	15,87±0,85	17,00±0,62	16,57±0,38	16,14 ^a
Mistura	14,10±0,46	15,53±0,21	15,63±0,06	15,87±1,07	17,13±2,32	16,67±1,82	15,82 ^{a,b}
Erva mate	14,43±1,47	15,30±0,56	16,23±0,72	15,77±0,45	16,53±0,64	16,67±0,84	15,82 ^{a,b}
Chá verde	14,27±0,67	14,87±0,51	14,93±0,12	14,87±0,21	14,70±0,56	16,70±0,79	15,06 ^{b,c}
BHA	14,20±1,87	14,80±1,04	14,93±1,07	14,30±0,56	14,17±1,55	15,13±0,57	14,59 ^c

¹ Valores apresentados como Média ± Desvio padrão (n = 3)

^{a-e} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p < 0,05) pelo procedimento GLM REGWQ

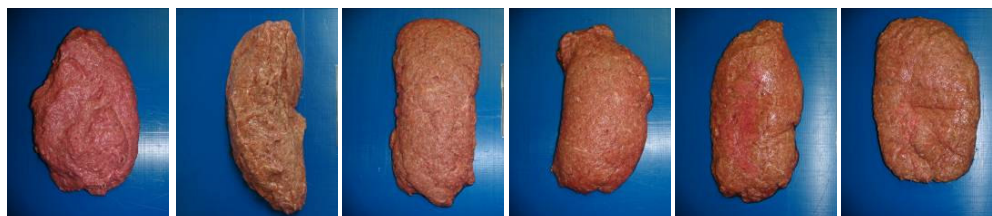
Controle Negativo (sem antioxidante)



Controle Positivo (BHA)



Extrato de Chá verde



Extrato de Própolis sem álcool



Figura 12: Fotos da superfície da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Frango, pertencentes aos tratamentos controle negativo (sem antioxidante), controle positivo (BHA), com extrato de chá verde e com extrato de própolis sem álcool nos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10 de estocagem sob refrigeração de 0 a +4°C.

Controle Negativo (sem antioxidante)



Controle Positivo (BHA)



Extrato de Erva mate



Extrato de Marcela

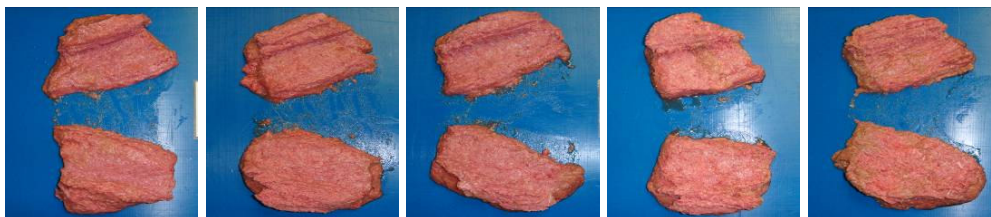


Mistura dos Extratos de Erva e Marcela

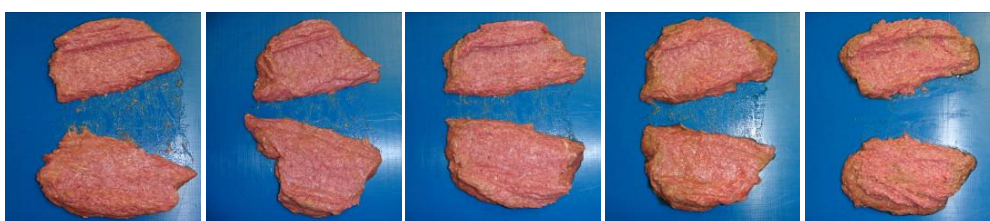


Figura 13: Fotos da superfície da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Frango, pertencentes aos tratamentos controle negativo (sem antioxidante), controle positivo (BHA), com extrato de erva mate, com extrato de marcela e com a mistura dos extratos de erva mate e marcela nos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10 de estocagem sob refrigeração de 0 a +4°C.

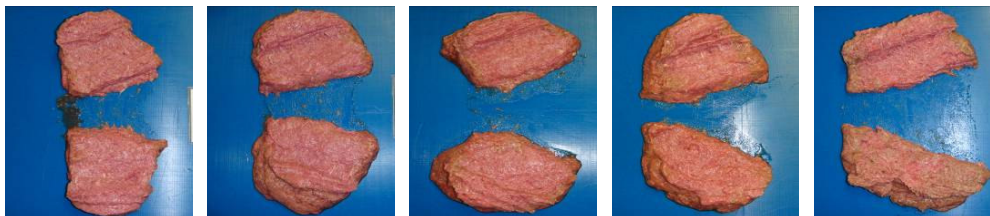
Controle Negativo (sem antioxidante)



Controle Positivo (BHA)



Extrato de Chá verde



Extrato de Própolis sem álcool

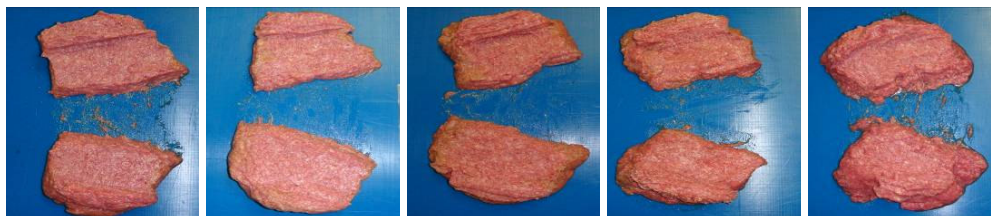
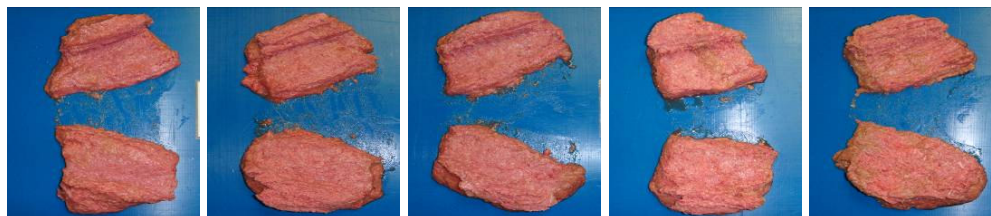
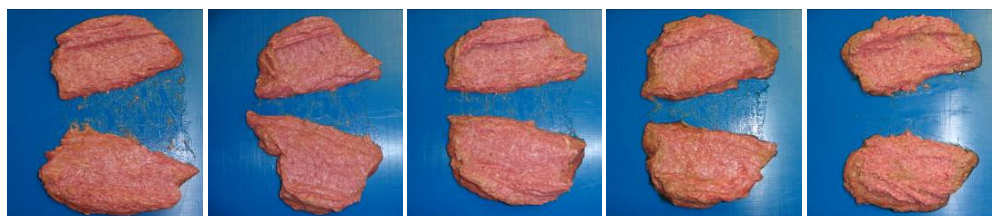


Figura 14: Fotos da parte interna da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Frango, pertencentes aos tratamentos controle negativo (sem antioxidante), controle positivo (BHA), com extrato de chá verde e com extrato de própolis sem álcool nos dias 2, 4, 6, 8 e 10 de estocagem sob refrigeração de 0 a +4°C.

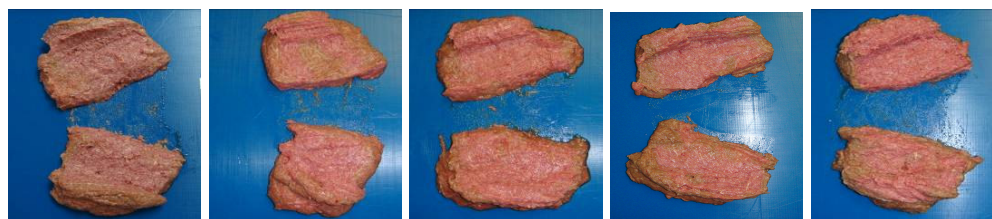
Controle Negativo (sem antioxidante)



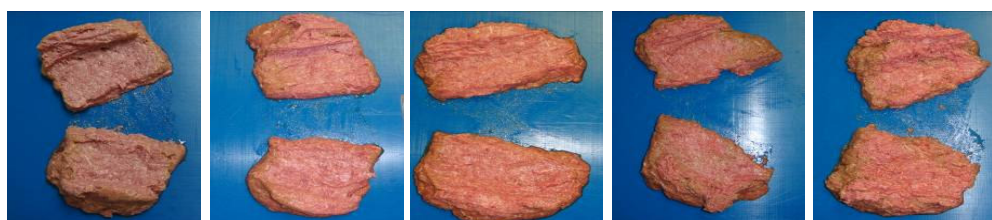
Controle Positivo (BHA)



Extrato de Erva mate



Extrato de Marcela



Mistura dos Extratos de Erva e Marcela

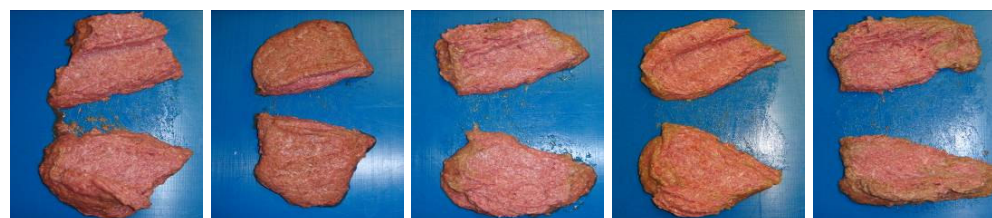


Figura 15: Fotos da parte interna da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Frango, pertencentes aos tratamentos controle negativo (sem antioxidante), controle positivo (BHA), com extrato de erva mate, com extrato de marcela e com a mistura dos extratos de erva mate e marcela nos dias 2, 4, 6, 8 e 10 de estocagem sob refrigeração de 0 a +4°C.

5.7 Estabilidade Microbiológica

Os resultados obtidos para contagem de Aeróbios Mesófilos Totais, Coliformes totais, *E. coli*, Bactérias lácticas e *C. perfringens* estão apresentados nos gráficos 10, 11, 12, 13 e 14 e na tabela 10.

Pelos resultados apresentados no gráfico 10, pode-se dizer que a contagem média de Aeróbios Mesófilos Totais aumentou para todos os tratamentos ao longo do período de estocagem. Notou-se a partir do sexto dia um aumento mais expressivo para o tratamento com extrato de erva mate, fato este também observado para os outros tratamentos (exceto para o controle negativo) a partir do oitavo dia de estocagem.

O tratamento com extrato de própolis apresentou contagem média máxima para Aeróbios Mesófilos Totais de $6,747 \pm 0,042 \log_{10}$ UFC/g durante o período de 10 dias de estocagem. Este foi o valor mais alto encontrado para esse microrganismo, seguido pelo tratamento controle ($6,678 \pm 0,010 \log_{10}$ UFC/g). Esses valores máximos foram encontrados no décimo dia de estocagem, sendo que na mesma data o menor valor obtido ($6,368 \pm 0,022 \log_{10}$ UFC/g) foi para o tratamento controle positivo (BHA). Todos esses valores não diferiram ($p > 0,05$) significativamente entre si.

Ostovar et al., (1971 apud FRONING, 1981) examinaram a carne mecanicamente separada de pescoço e dorso de frango em relação a contagem de Aeróbios Mesófilos Totais, Coliformes fecais, *Salmonella* e *C. perfringens*, processada de duas diferentes formas. A carne que foi desossada imediatamente após processamento/desossa manual das aves (processo convencional) apresentou aumento da contagem de Aeróbios Mesófilos Totais durante a estocagem a 3°C. A contagem de Coliformes fecais foi alta para todas as amostras e se manteve alta durante o armazenamento a 3°C. A refrigeração reduziu substancialmente a contagem de Coliformes fecais. De um total de 54 amostras, seis amostras estavam contaminadas com *Salmonella* e quatro apresentaram presença de *C. perfringens*. Este trabalho apresentou resultado similar ao encontrado por Ostovar et al. (1971) em relação a contagem de Aeróbios Mesófilos Totais, já que a contagem média deste microrganismo aumentou durante o armazenamento de 0 a +4°C durante 10 dias, mas resultados diferentes e melhores para *Salmonella*, pois não foi detectada a presença desse microrganismo em nenhuma amostra durante todo o período de estocagem.

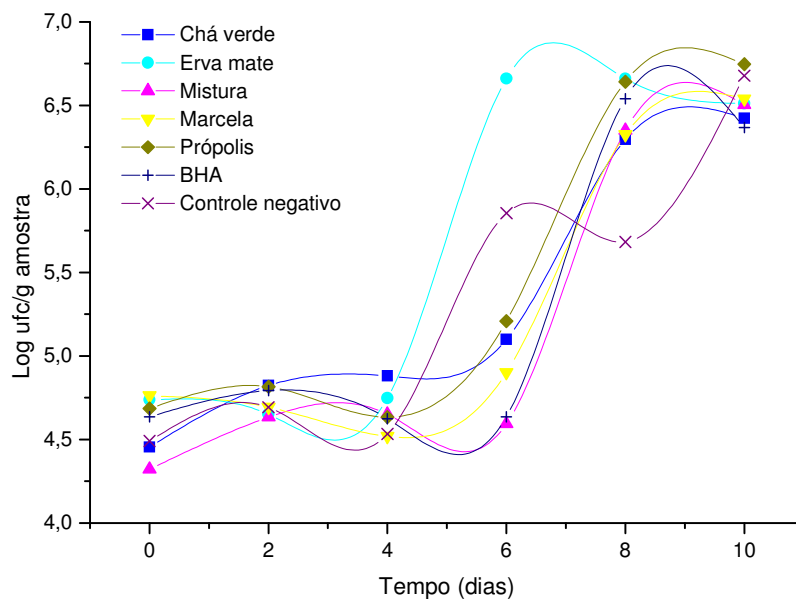


Gráfico 10: Contagem média de microrganismos Aeróbios Mesófilos Totais (Log₁₀ UFC/g) em Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango sem adição de antioxidantes (controle negativo) e adicionada de extrato de erva mate (0,50%), extrato de marcela (0,50%), da mistura dos extratos de erva mate e marcela (0,50%), do extrato de própolis sem álcool (0,10%), do extrato de chá verde (0,05%) e do antioxidante sintético BHA (0,02%), mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.

As menores contagens médias de Aeróbios Mesófilos Totais do período foram apresentadas pelo tratamento da mistura de extratos de erva mate e marcela, que apresentou redução significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo (tabela 10). Os tratamentos da mistura de ervas e controle positivo (BHA) não são diferentes estatisticamente ($p > 0,05$) entre si (tabela 10). Este bom resultado obtido pela mistura é devido ao efeito positivo do extrato da marcela na mistura. Importante notar que o tratamento com a mistura de extratos apresentou no sexto dia, contagem média de Aeróbios Mesófilos Totais menores que aquelas apresentadas pelos seus componentes isolados (gráfico 10), o que pode indicar algum efeito sinérgico entre os extratos utilizados nessa mistura. O tratamento com extrato de erva mate apresentou a maior contagem média do período, diferindo ($p < 0,05$) de todos os demais tratamentos (tabela 10). Muitos compostos fenólicos são adicionados em alimentos como agentes antioxidantes e/ou antimicrobianos (ATROSHI et al., 2003). Mas a natureza lipofílica dos fenóis pode reduzir suas propriedades antimicrobianas (BARANOWSKI; NAGEL, 1984),

o que pode explicar o fato de alguns extratos não apresentarem efeito positivo frente a alguns microrganismos.

A avaliação dos resultados da contagem média de Aeróbios Mesófilos Totais pelo tempo mostra que não houve diferença ($p>0,05$) significativa nos 4 primeiros dias. A diferença ($p<0,05$) ocorreu no restante do período, com o aumento da contagem média, fazendo com que os dias 6, 8 e 10 de estocagem fossem diferentes ($p<0,05$) entre si e em relação aos 4 primeiros dias. O décimo dia apresentou a maior ($p<0,0001$) contagem média para esse microrganismo em relação aos demais dias (tabela 10).

De acordo com o gráfico 11, a contagem média de Coliformes Totais apresentou tendência a reduzir a partir do sexto dia de estocagem. Chama a atenção a redução expressiva da contagem média ocorrida no décimo dia para o tratamento com extrato de própolis sem álcool, o que não ocorreu nos outros tratamentos.

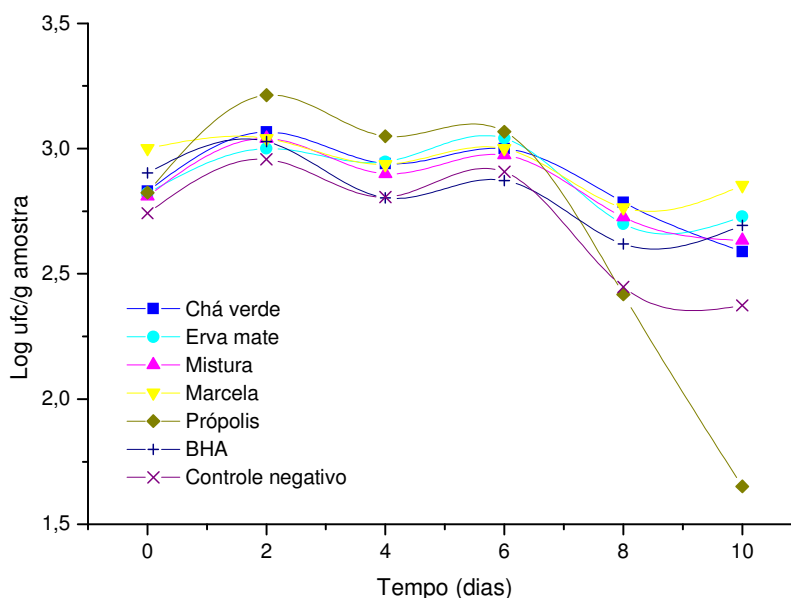


Gráfico 11: Contagem média de microrganismos Coliformes Totais (Log₁₀ UFC/g) em Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango sem adição de antioxidantes (controle negativo) e adicionada de extrato de erva mate (0,50%), extrato de marcela (0,50%), da mistura dos extratos de erva mate e marcela (0,50%), do extrato de própolis sem álcool (0,10%), do extrato de chá verde (0,05%) e do antioxidante sintético BHA (0,02%), mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.

A tabela 10 mostra, pelas médias do período, haver diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos com extrato de marcela (o que apresentou maior contagem média), controle positivo (BHA) e o controle negativo (sem antioxidante). O tratamento com extrato de própolis sem álcool não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao tratamento controle negativo e apresentou a menor contagem média ($2,703 \pm 0,556 \log_{10}$ UFC/g) do período para Coliformes Totais em relação aos demais tratamentos. Os tratamentos com extrato de erva mate, com a mistura dos extratos de erva mate e marcela e com extrato de chá verde não são diferentes ($p > 0,05$) entre si (tabela 10).

Milani et al. (2001) estudaram os efeitos antimicrobianos dos extratos alcoólico e metanólico do chá verde, chá preto e da erva mate em carne mecanicamente separada de frango, conservadas a 5°C e a -25°C , e encontraram que os extratos não proporcionaram proteção antimicrobiana efetiva na CMS de frango. Com exceção ao tratamento com extrato de própolis sem álcool, as contagens médias de Coliformes Totais do período foram maiores para os tratamentos que utilizaram extratos naturais em relação ao tratamento controle negativo. Pode-se dizer, portanto, que os extratos utilizados neste trabalho também não proporcionaram proteção antimicrobiana efetiva na CMS de frango em relação a Coliformes Totais (tabela 10).

Terra et al. (2000) verificaram os efeitos antimicrobianos do extrato de chá preto, extrato de alecrim e do lactato de sódio em carne mecanicamente separada de frango, conservada por 15 dias a 5°C e encontraram que o extrato de chá preto provocou inibição no desenvolvimento de microrganismos Psicotróficos e de Coliformes Totais, aumentando a estabilidade microbiológica da CMS. Neste trabalho, a aplicação de extratos naturais na CMS também proporcionou a inibição do desenvolvimento de Coliformes Totais a partir do sexto dia de estocagem (gráfico 11).

A avaliação da contagem média de Coliformes Totais pelo tempo mostra a redução dos valores a partir do oitavo dia de análise. Os 4 últimos dias de estocagem diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos 6 primeiros dias. O segundo dia de estocagem apresentou a maior ($p < 0,0001$) contagem média em relação aos demais dias (tabela 10).

Efeito similar ocorreu durante o período de estocagem para a contagem média de *E. coli* (gráfico 12), tanto em relação a tendência de redução dessa população microbiana a partir do sexto dia de estocagem quanto em relação a performance da própolis, que novamente reduziu de forma expressiva a contagem média desse microrganismo no décimo dia de estocagem.

Nos últimos anos, a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis tem sido relatada, sendo esta atividade devido aos flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres presentes na resina natural (GEBARA et al., 2002). Os ácidos caféico e ferrúlico também contribuem para a ação bactericida da própolis. O mecanismo da atividade antimicrobiana é complexo, podendo ser devido ao efeito sinérgico entre flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos (MARCUCCI, 1995). Tais fatores podem explicar a ação positiva do extrato de própolis neste trabalho frente a alguns microrganismos, como os Coliformes Totais, *E. coli* e *C. perfringens*, onde apresentou as menores contagens médias do período (tabela 10).

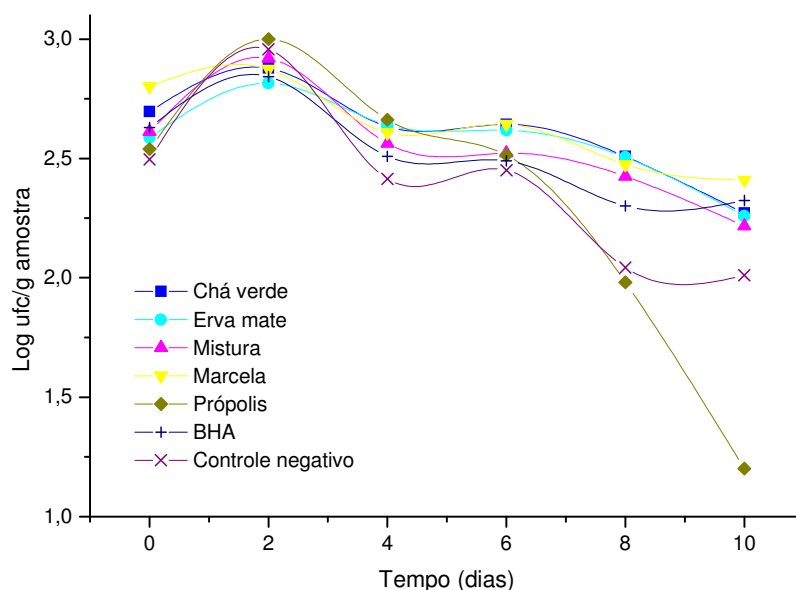


Gráfico 12: Contagem média de microrganismos *E. coli* (Log₁₀ UFC/g) em Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango sem adição de antioxidantes (controle negativo) e adicionada de extrato de erva mate (0,50%), extrato de marcela (0,50%), da mistura dos extratos de erva mate e marcela (0,50%), do extrato de própolis sem álcool (0,10%), do extrato de chá verde (0,05%) e do antioxidante sintético BHA (0,02%), mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.

O tratamento com extrato de própolis sem álcool teve a menor contagem média de *E. coli* ($2,316 \pm 0,609 \log_{10}$ UFC/g) do período, diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos que utilizaram extratos naturais (tabela 10). Com exceção dos tratamentos com extrato de própolis sem álcool e do controle negativo, todos os tratamentos que utilizaram extrato natural não diferiram significativamente ($p > 0,05$) em relação ao controle positivo (BHA) (tabela 10). Avaliando os resultados da contagem média de *E. coli* pelo tempo

percebe-se a redução da contagem desse microrganismo a partir do quarto dia de estocagem, ocorrendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dias 6, 8 e 10. O décimo dia apresentou a menor ($p < 0,0001$) contagem média de *E. coli* em relação aos demais dias (tabela 10).

O tratamento controle negativo apresentou contagem média de 2,496 \log_{10} UFC/g no dia zero de análise para a carne mecanicamente separada (CMS) de frango. Este valor foi maior que o encontrado por Trindade et al. (2008), que foi de 2,2 \log_{10} UFC/g em carne mecanicamente separada (CMS) de galinhas. Essa diferença pode estar relacionada com a qualidade microbiológica inicial da matéria prima utilizada na elaboração da CMS, e também com o comportamento desta durante a extração.

A resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 (ANVISA, 2008), estabelece como único indicador microbiológico para carnes resfriadas (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes) o número de coliformes fecais, igual a 10^4 NMP/g. A média dos valores obtidos nesse trabalho para *E. coli*, em todos os tratamentos durante os 10 dias de estocagem ficou próxima a 10^2 NMP/g. Portanto, em termos microbiológicos, a carne mecanicamente separada (CMS) de frango desse trabalho, independente do tratamento utilizado, atendeu aos padrões estabelecidos pela Legislação Brasileira.

A contagem média de Bactérias lácticas (gráfico 13) aumentou para todos os tratamentos durante os 8 primeiros dias de estocagem, atingindo os maiores valores neste dia, e reduzindo consideravelmente no décimo dia. As menores contagens médias no décimo dia ficaram por conta dos tratamentos com extrato de erva mate ($1,744 \pm 0,041 \log_{10}$ UFC/g) e do extrato de chá verde ($1,933 \pm 0,080 \log_{10}$ UFC/g). Os tratamentos com extrato de própolis sem álcool e extrato de marcela apresentaram os maiores valores médios para a mesma data ($2,301 \pm 0,301 \log_{10}$ UFC/g).

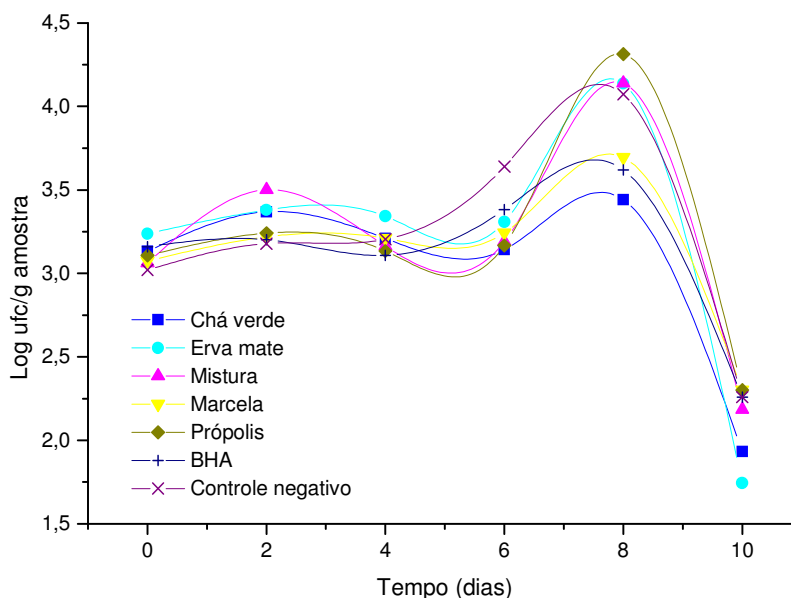


Gráfico 13: Contagem média de microrganismos Bactérias lácticas (Log_{10} UFC/g) em Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango sem adição de antioxidantes (controle negativo) e adicionada de extrato de erva mate (0,50%), extrato de marcela (0,50%), da mistura dos extratos de erva mate e marcela (0,50%), do extrato de própolis sem álcool (0,10%), do extrato de chá verde (0,05%) e do antioxidante sintético BHA (0,02%), mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.

Existem estudos que indicam que as catequinas do chá verde contêm constituintes antimicrobianos, e que a atividade antimicrobiana das catequinas depende de vários fatores, como do tipo, da concentração e do tipo dos microrganismos presentes (YILMAZ, 2006).

A menor ($p < 0,01$) contagem média do período ocorreu no tratamento com extrato de erva mate. A contagem média pelo tempo apresentou redução apenas no décimo dia de estocagem, sendo esta significativamente diferente ($p < 0,05$) dos demais dias. O oitavo dia de estocagem apresentou a maior ($p < 0,0001$) contagem média de Bactérias lácticas em relação aos demais tratamentos (tabela 10).

Não há padrões estabelecidos na Legislação Brasileira para a contagem máxima de Bactérias lácticas permitida em carne mecanicamente separada (CMS) de ave.

O gráfico 14 apresenta as contagens médias de *C. perfringens*, onde observou-se que, para todos os tratamentos, a partir do sexto dia de estocagem sob refrigeração houve uma redução expressiva na população desse microrganismo.

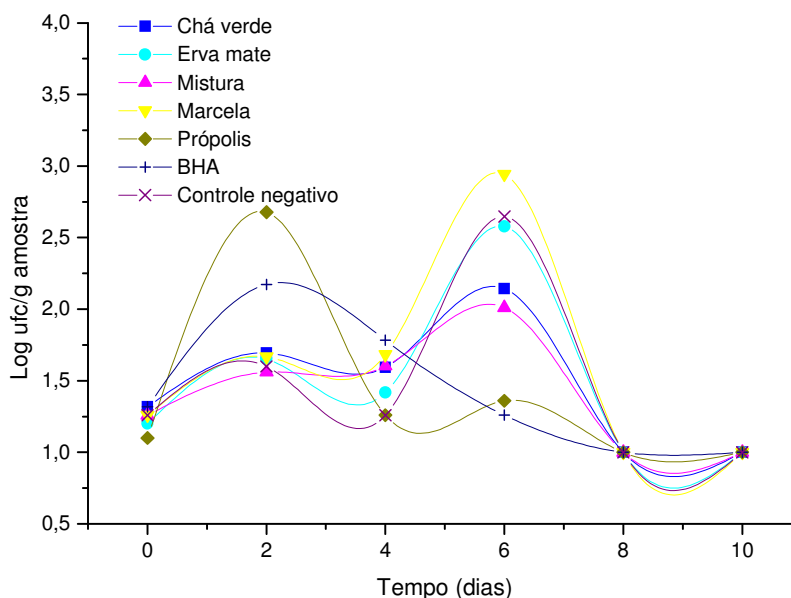


Gráfico 14: Contagem média de microrganismos *Clostridium perfringens* (Log_{10} UFC/g) em carne mecanicamente separada (CMS) de frango sem adição de antioxidantes (controle negativo) e adicionada de extrato de erva mate (0,50%), extrato de marcela (0,50%), da mistura dos extratos de erva mate e marcela (0,50%), do extrato de própolis sem álcool (0,10%), do extrato de chá verde (0,05%) e do antioxidante sintético BHA (0,02%), mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias.

Esses microrganismos se multiplicam melhor em pH de 6,0 a 7,0 (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Observa-se que os resultados de pH de todos os tratamentos no oitavo e décimo dias estavam dentro dessa faixa (tabela 06), mas a contagem média diminuiu (gráfico 14). Ainda segundo estes autores, uma das características mais importantes do *C. perfringens* é sua capacidade de multiplicação em alta temperatura, sendo a temperatura ótima entre 40 e 45°C, e a temperatura mínima de 15°C. Portanto, o fato das amostras de carne mecanicamente separada de frango terem sido conservadas sob refrigeração de 0 a 4°C pode ter inibido o crescimento desse microrganismo. Apesar de apresentar a maior contagem média de *C. perfringens* no segundo dia de estocagem, o tratamento com extrato de própolis sem álcool reduziu a contagem média desse microrganismo a partir do quarto dia de análise (gráfico 14) e se manteve com baixas contagens médias até o final do período de 10 dias.

A validade da carne mecanicamente separada de frango tem sido um problema, influenciando as investigações de técnicas que permitam prolongar a validade da mesma. MacNeil et al. (1973 apud FRONING, 1981) observaram que o extrato de alecrim, o BHA e o ácido cítrico reduziram as contagens de bactérias em carne mecanicamente separada de

frango, dessa forma, aumentando sua validade. Neste trabalho o tratamento com extrato de própolis reduziu as contagens médias de Coliformes Totais, *E. coli* e *C. perfringens* (tabela 10), fator importante para o aumento da validade da CMS de frango.

A tabela 10 mostra que os tratamentos com extrato de marcela e com extrato de própolis apresentaram a maior e menor contagem média para *C. perfringens*, respectivamente. Todos os tratamentos não diferiram estatisticamente ($p>0,05$) entre si. Observa-se que a contagem média de *C. perfringens* aumentou com o tempo até o sexto dia, onde apresentou a maior ($p<0,0001$) contagem média, diminuiu e se manteve constante e de igual valor nos últimos 4 dias (tabela 10). A adição ou não de antioxidantes naturais na CMS de frango não apresentou interação significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos para a contagem média do período de *C. perfringens* (tabela 10). De acordo com Brasil (2000a), a contagem máxima aceitável para *C. perfringens* é de 1×10^3 UFC/g. Com exceção do tratamento com extrato de marcela, que no sexto dia apresentou contagem média de $1,96 \times 10^3$ UFC/g, todos os outros tratamentos apresentaram valores dentro do padrão estabelecido pela Legislação Brasileira.

Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras analisadas durante todo o período de estocagem. Este resultado está de acordo com o definido no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Carne Mecanicamente Separada de Ave (Brasil 2000a), que estabelece para *Salmonella* spp o resultado negativo em 25 g. Os resultados encontrados para *Staphylococcus aureus* foram iguais para todos os tratamentos, durante todo o período de avaliação, e foi de $< 1,0 \times 10$ UFC/g, estando esse resultado também de acordo com o Regulamento, que estabelece como valor máximo aceitável 5×10^3 UFC/g.

Se o número de bactérias na superfície da carne exceder 1×10^8 UFC/g, a carne estará inviável para o consumo humano. Se a contagem microbiológica for de 1×10^7 UFC/g, a carne não terá boa qualidade (NURMI; RING, 1999). Sendo assim não poderá ser utilizada para a elaboração da CMS, e principalmente, não poderá ser consumida.

Neste trabalho, a contagem máxima de Aeróbios Mesófilos Totais foi de 10^6 UFC/g para o tratamento com extrato de erva mate a partir do sexto dia e para os demais tratamentos a partir do oitavo dia de estocagem da CMS de frango sob refrigeração de 0 a +4°C. Portanto, todos os tratamentos estão adequados para uso em produtos cárneos. Importante salientar que a CMS só poderá ser usada em produtos cárneos cozidos, e que portanto essa carga será ainda menor após processo de cozimento do produto.

Tabela 10. Efeito dos extratos naturais sobre os microrganismos da Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango mantida sob refrigeração de 0 a +4°C durante 10 dias (resultados expressos como Log₁₀ UFC/g amostra):

Efeito	Aeróbios Mesófilos Totais	Coliformes totais	<i>E. coli</i>	Bactérias lácticas	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Tratamento</i>					
Controle	5,323±0,852 ^{b,c}	2,705±0,256 ^c	2,395±0,374 ^b	3,229±0,611 ^a	1,461±0,622
Própolis	5,455±0,925 ^b	2,703±0,556 ^c	2,316±0,609 ^b	3,211±0,642 ^a	1,399±0,642
Marcela	5,290±0,858 ^{b,c}	2,932±0,104 ^a	2,635±0,183 ^a	3,124±0,455 ^{a,b}	1,592±0,728
Mistura	5,176±0,939 ^d	2,847±0,153 ^{a,b}	2,543±0,237 ^a	3,207±0,636 ^a	1,405±0,395
Erva mate	5,662±0,983 ^a	2,873±0,145 ^{a,b}	2,571±0,179 ^a	3,192±0,783 ^a	1,475±0,597
Chá verde	5,329±0,798 ^{b,c}	2,869±0,180 ^{a,b}	2,605±0,198 ^a	3,038±0,555 ^b	1,458±0,443
BHA	5,266±0,875 ^d	2,820±0,174 ^b	2,516±0,246 ^a	3,122±0,462 ^{a,b}	1,422±0,466
<i>Tempo (dia)</i>					
0	4,584±0,211 ^d	2,847±0,080 ^c	2,623±0,101 ^b	3,114±0,108 ^c	1,245±0,230 ^d
2	4,729±0,127 ^d	3,049±0,080 ^a	2,898±0,070 ^a	3,298±0,129 ^b	1,860±0,435 ^b
4	4,656±0,156 ^d	2,912±0,092 ^{b,c}	2,575±0,108 ^b	3,196±0,086 ^{b,c}	1,514±0,266 ^c
6	5,279±0,712 ^c	2,980±0,067 ^{a,b}	2,554±0,080 ^b	3,296±0,189 ^b	2,135±0,690 ^a
8	6,357±0,423 ^b	2,637±0,190 ^d	2,320±0,277 ^c	3,917±0,331 ^a	1,000±0,000 ^c
10	6,539±0,132 ^a	2,503±0,407 ^c	2,099±0,436 ^d	2,141±0,304 ^d	1,000±0,000 ^c
<i>Trat.</i>	***	***	***	**	NS
<i>Tempo</i>	***	***	***	***	***
<i>Trat.xTempo</i>	***	***	***	***	***

NS: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$

^{a-c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo procedimento GLM REGWQ

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que:

- o extrato de chá verde apresentou a maior quantidade de compostos fenólicos;
- o extrato de erva mate apresentou a maior quantidade de flavonóides;
- o extrato de própolis sem álcool apresentou as menores quantidades de compostos fenólicos e de flavonóides;
- o extrato de marcela apresentou o melhor efeito na estabilidade oxidativa da CMS pelos baixos valores de TBARS apresentados;
- o uso dos extratos naturais de erva mate, marcela, da mistura de erva mate e de marcela, de chá verde e de própolis inibiram a oxidação lipídica, não interferiram no pH e nem no índice de peróxido da carne mecanicamente separada (CMS) de frango;
- não há uma relação entre a alta atividade antioxidante identificada *in vitro* e a determinada na CMS de frango;
- os extratos de marcela, de erva mate, de própolis sem álcool e a mistura de extratos de marcela e erva mate interferiram na cor e no odor da CMS de frango;
- a medida de cor objetiva não permite afirmar ou mesmo estabelecer diferenças entre os tratamentos, por ser por vezes divergente da cor registrada através das fotos;
- o tratamento com a mistura dos extratos de erva mate e de marcela apresentou a menor contagem média de Aeróbios Mesófilos Totais. O extrato de própolis sem álcool apresentou a menor contagem média de Coliformes Totais, *E. coli* e *C. perfringens*. O extrato de erva mate apresentou a menor contagem média de Bactérias lácticas. Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. e os resultados encontrados para *Staphylococcus aureus* foram iguais para todos os tratamentos e dentro dos padrões estabelecidos pela Legislação Brasileira.

O uso de antioxidantes naturais pode trazer benefícios em relação a inibição da população microbiana da CMS de frango.

Mais estudos são fundamentais para melhor entendimento dos mecanismos de ação de cada extrato sobre a oxidação lipídica e sobre a microbiota da CMS de frango.

7 SUGESTÕES

Sugestões para trabalhos futuros:

1. alterar as quantidades de aplicação do extrato de chá verde e do extrato de própolis sem álcool, visando verificar qual percentual é o mais indicado para a CMS de frango. Aqui é importante ressaltar o relatado por Barreto et al. (2003), que encontrou que a adição aumentada (dobro) de determinados antioxidantes naturais em carne de frango moída e refrigerada a 4°C não necessariamente significará em inibição similar da oxidação lipídica;
2. uma investigação mais apurada em relação as estruturas moleculares dos principais componentes dos extratos deste trabalho visando entendimento sobre sua interferência e eficiência quando aplicado em carnes;
3. que a avaliação da susceptibilidade antimicrobiana seja feita pela comparação dos resultados microbiológicos da carne contendo os extratos com os resultados metodológicos de atividade antimicrobiana destes extratos;
4. que em aplicações futuras faça-se uso da desodorização dos extratos de erva mate, marcela, da mistura e de alguma forma da própolis, visando minimizar os problemas de alteração de cor e odor ao longo do período de estocagem, encontrados na CMS de frango como ocorreu nesse trabalho;
5. que após a aplicação dos extratos antioxidantes naturais na CMS de frango, a mesma seja utilizada na elaboração de algum produto cárneo cozido, visando entender o comportamento da carne nessas condições no produto final, em relação a alguma possível interferência sensorial, efeitos sobre a oxidação bem como o comportamento do extrato submetido indiretamente a altas temperaturas durante cozimento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEF. Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango. Relatório Anual 2007/2008. Disponível em:
http://www.abef.com.br/noticias_portal/exibenoticia.php?notcodigo=415 Acesso em: 05 de setembro de 2008.

ADEGOKE, G. O. et al. Antioxidants and lipid oxidation in foods – a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 35, n. 4, p. 283-298, July/Aug. 1998.

ADDIS, P. B.; CSALLANY, A. S.; KINDOM, S. E. Some lipid oxidation products as xenobiotics. In: FINLEY, J. W.; SCHWASS, D. E. **Xenobiotics in Foods and Feeds**. Washington: American Chemical Society, 1983. p. 234:85. (ACS Symposion Series).

ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA-MATE. Atividade importante no Sul do País. Santa Cruz do Sul: Grupo de Comunicações Gazeta, 1999. p. 53-55.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, 2 de janeiro 2001**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm Acesso em 10 de outubro de 2008.

AMBIEL, C.; WURLITZER, N. J. Carne mecanicamente separada de frango (CMS) – propriedades funcionais e qualidade. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, v. 24, n. 281, p. 130-135, jul. 2000.

AOAC INTERNATIONAL in the Compendium of Microbiological Methods for the Analysis of Food and Agricultural Products. **Enumeration of total aerobic bacteria in food products and food ingredients using 3M™ Petrifilm™ aerobic count plates. Government of Canada – Health products and Food Branch – MFHPB-33, Feb, 2001, 2002.**

_____. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30°C - ISO 15214 First edition, 1998, 2002.**

_____. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for enumeration of *Clostridium perfringens* – Colony-count technique. International Standard ISO 7937. Second edition, 1997, 2002.**

_____. Enumeration of *E. coli* and Coliforms in food products and food ingredients using 3M™ Petrifilm™ *E. coli* count plates. Government of Canada – Health products and Food Branch – MFHPB-34, Feb, 2001, 2002.

_____. Microbiology - general guidance on methods for detection of Salmonella method. International Standard ISO 65792 Third edition, 1993, 2002.

_____. Enumeration of *Staphylococcus aureus* bacteria in food products and food ingredients using 3M Petrifilm *Staphylococcus aureus* count plates. Government of Canada - Health products and Food Branch - MFHPB - 11, 2003.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**, 3. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2004.

ASOLINI, F. C. et al. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 209-215, jul./dez. 2006.

ATROSHI, F. et al. Antioxidant nutrients and mycotoxins. **Toxicology**, London, v. 180, n. 2, p. 151-167, Nov. 2003.

BABJI, A. S. et al. Quality of mechanically deboned chicken meat frankfurter incorporated with chicken skin. **International Journal Food Sciences Nutrition**, Basingstoke, v. 49, n. 5, p. 319-326, 1998.

BARANOWSKI, J. D.; NAGEL, C. W. Antimicrobial and antioxidant activities of alkyl hydroxycinnamates (alkacins) in model systems. **Canadian of Institute Food Science and Technology Journal**, v. 17, p. 79-85, 1984.

BARBUT, S. Colour measurements for evaluating the pale soft exsudative (PSE) occurrence in turkey meat. **Food Research International**, Barking, v. 26, n. 1, p. 39-43, 1993.

BARRETO, A. C. S. et al. Empirical models for describing poultry meat lipid oxidation inhibition by natural antioxidants. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, n. 5, p. 587-594, Oct. 2003.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. de. **Fundamentos de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1998. v. 3.

BASTOS, D. H. M.; TORRES, E. A. F. S. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 26, n. 7, p. 77-89, jan./jun. 2003.

BELTRAN, E. et al. Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values. **Meat Science**. Barking, n. 1, v. 64, p. 19-25, May 2003.

BENTHSATH, A.; RUSZNYAK, S.; SZENT-GYÖRGY, A. Vitamin nature of flavone. In: _____. **Flavonoids in Health and Disease**. New York: Marcel Dekker, 1936. p. 137-161.

BERAQUET, N. J. Panorama da carne de frango mecanicamente separada. **Avicultura e Suinocultura Industrial**, São Paulo, v. 954, n. 6, p. 75-79, 1989.

_____. **Como aproveitar toda a carne de frango.**, 1990. p. 35-40. (Informe Técnico-Avicultura e Suinocultura Industrial)

_____. Carne mecanicamente separada de aves. In: SEMINÁRIO E CURSO TEÓRICO-PRÁTICO “AGREGANDO VALOR A CARNE DE AVES”, 2000, Campinas. **Carne mecanicamente separada de aves** Campinas: ITAL, 2000. v.1.

BIXBY, M. et al. *Ilex paraguariensis* extract are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sciences**, Elmsford, v. 77, n. 3, p. 345-358, June 2005.

BOLES, J. A.; PEGG, R. Meat color. **Montana State University and Saskatchewan Food Product Innovation Program University of Saskatchewan**. Disponível em: http://animalrange.montana.edu/Docs/meat_color.htm Acesso em: 01 de setembro de 2007.

BOU, R. et al. Influence of dietary fat source, α -tocopherol and ascorbic acid supplementation on sensory quality of dark chicken meat. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, n. 6, p. 800-807, June 2001.

BOZKURT, H. Utilization of natural antioxidants: Green tea extract and *Thymbra spicata* oil in Turkish dry-fermented sausage. **Meat Science**, Barking, v. 73, n. 3, p. 442-450, July 2006.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº1004 de 11 de dezembro de 1998. Atribuição de Funções de Aditivos, Aditivos e seus limites máximos de uso para a Categoria 8 – Carnes e Produtos Cárneos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, republicado em de 14 de dezembro de 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. Normativa nº4 de 31 de março de 2000 – Anexo I – Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Aves, Bovinos e Suínos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, publicado em 05 de abril de 2000a.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. Normativa nº4 de 31 de março de 2000 – Anexo I – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Mortadela, Lingüiça, Salsicha, Almôndega, Hamburguer e Fiambre. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, publicado em 05 de abril de 2000b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de 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] República Federativa do Brasil**, publicado em 27 de jul. de 1999.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, Nov. 1998.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee products. **Food and Chemical Toxicology**, Vero Beach, v. 36, n. 4, p. 346-363, Apr. 1998.

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

CAMPOS, A. M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E. A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguariensis* extracts and red wine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 7, n. 1, p. 43-49, 1996.

CANTERLE, L. P. **Erva-mate e atividade antioxidante**. 2005. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

CARDOSO, A. L. S. P. et al. Pesquisa de *Salmonella* spp, coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos em carcaças e cortes de frango. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 128, p. 144-150, jan./fev. 2005.

CARINI, M. et al. Characterization of phenolic antioxidants from Maté (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, n. 22, p. 1813-1819, nov. 1998.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L. *Salmonella* spp em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1465-1468, nov./dez. 2005.

CARVALHO, A. C. F. B. et al. Presença de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 303-307, 2005a.

CHEN, Z. Y. et al. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. **Chemistry and Physics of Lipids**, Hong Kong, v. 79, n. 2, p. 157-163, Marc. 1996.

CHIPAULT, J.R. et al. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, v. 17, p. 46-55, 1952.

CORNFORTH, D. Color – its basis and importance. In: PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. (Ed.) **Advances in meat research: quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products**. 1st. New York: AVI Book, 1994.

COSGROVE, J. P. et al. The kinetics of autoxidation of polyunsaturated fatty acids. **Lipids**, Heidelberg, v. 22, n. 5, p. 299-304, Apr. 1987.

COSTA, C. M. **Oxidação dos lipídios da carne mecanicamente separada (CMS) de frango**. 1994. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

COUNSELL, J. N.; HORNIG, D. H. **Vitamin C (ascorbic acid)**. London: Applied Science, 1981. cap. 7.

COUPLAND, J. N.; McCLEMENTS, D. J. Lipid oxidation in food emulsions. **Trends in Food Science & Technology**, Amherst, v. 7, n. 3, p. 83-91, Mar. 1996.

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

CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Comparison of the antioxidant activity of some acid phenols: structure-activity relationship. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 59, n. 3, p. 324-325, Mar. 1992.

DAWSON, L. E.; GARTNER, R. Lipid oxidation in mechanically deboned poultry. **Food Technology**, Chicago, v. 37, n. 6, p. 112-116, June 1983.

DEGENHARDT, J. Carne mecanicamente separada (CMS). In: OLIVO, R. (Ed.) **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. Criciúma: Ed. do Autor, 2006.

DESCALZO, A. M.; SANCHO, A. M. A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. **Meat Science**, Barking, v. 79, n. 3, p. 423-436, July 2008.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. ("marcela"). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 9, p. 1163-1170, Sept. 1998.

DEWANTO, V. et al. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 10, p. 3010-3014, Oct. 2002.

DORMAN, H. J. D. et al. Characterization of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, London, v. 83, n. 2, p. 255-262, Nov. 2003.

DURÁN, R. M.; PADILLA, R. B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 44, n. 2, p.101-106, mar./abr. 1993.

FERNANDEZ, C. L. Carne separada mecanicamente. **Revista ABIA: Alimentação**, São Paulo, p. 32-36, nov./fev. 1986.

FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ,-LOPEZ, J. A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chemistry**, London, v. 59, n. 3, p. 345-353, July 1997.

FERRARO, E.G.; NORBEDO, C.; COUSSIO, J. Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. **Phytochemistry**, New York, v. 20, n. 8, p. 2053-2054, Aug. 1981.

FERREIRA, I. C. F. R. et al. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 4, p. 1511-1516, 2007.

FIELD, R. A. Mechanical separated meat of poultry and fish. Edible meat by products: advances in meat research. **Elsevier applied science**, v. 5, p. 83-126, 1988.

FILIP, R. et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, Oct. 2000.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FRANKEL, E. N. et al. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 5, p. 1054-1059, May 1994.

FRANKEL, E. N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. **Food Chemistry**, London, v. 57, n. 1, p. 51-55, Sept. 1996.

FRANKEL, E. N. et al. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 1, p. 131-135, Jan. 1996a.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. Review: the problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food Agriculture**, London, v. 80, p. 1925-1941, 2000.

FRONING, G. W. Mechanical deboning of poultry and fish. **Advances in food Research**, San Diego, v. 27, p. 109-147, 1981.

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

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

GADOW, A.; JOUBERT, E.; HANSMANN, C. F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT and BHA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 3, p. 623-638, Mar. 1997.

GALVÃO, M. T. E. L. **Industrialização da carne de frango**. Campinas: Centro de Tecnologia de Carnes – ITAL, 1992. 78 p.

GANDEMER, G. Muscle phospholipids; composition and changes induced by processing. **Revue Française dès Corps Gras**, Nantes, v. 37, n. 3-4, p. 75-81, 1990.

GAVA, A. J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**, 1. ed. São Paulo: Nobel, 1984.

GEBARA, E. C. E.; LIMA, L. A.; MAYER, M. P. A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, Oct./Dec. 2002.

GOUVÊA, A. A. L. de; GOUVÊA, J. A. G. de. **Dossiê técnico: Carne mecanicamente separada**. Salvador: Rede de Tecnologia da Bahia (RETEC/BA), 2007, p. 01-26.

GRUNDEN, L. P.; MacNEIL, J. H.; DIMICK, P. S. Poultry product quality: chemical and physical characteristics of mechanically deboned poultry meat. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 37, n. 2, p. 247-249, Mar./Apr. 1972.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of Human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 224, n. 2, p. 338-344, July 1996.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. The botanical extracts of *Achyrocline satureioides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. **Life Sciences**, Elmsford, v. 72, n. 3, p. 279-292, Dec. 2003.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A. J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, Illkirch Cedex, v. 35, n. 1, p. 47-56, Jan. 1995.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3th ed. New York: Oxford Science Publications, 2000. 936p.

HAN, D-W. et al. Effects of green tea polyphenol on preservation of human saphenous vein. **Journal of Biotechnology**, Seoul, v. 110, n. 2, p. 109-117, May 2004.

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

HASSAN, O.; FAN, L. S. The anti-oxidation potential of polyphenol extract from cocoa leaves on mechanically deboned chicken meat. **LWT – Food Science and Technology**, Bangi, v. 38, n. 4, p. 315-321, June 2005.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E. et al. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. **Meat Science**, Barking, v. 81, n. 2, p. 410-417, Feb. 2009.

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

HUANG, S-W. et al. Antioxidant activity of carnosic acid and methyl carnosate in bulk oils and oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, vol. 44, n. 10, p. 2951-2956, Oct. 1996.

IGENE, J. O.; PEARSON, A. M. Role of phospholipids and triglycerides in warmed-over flavor development in meat model systems. **Journal Food Science**, Chicago, v. 44, p. 1285-1290, 1979.

IKAWA, M. et al. Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton., v. 51 n. 7, p. 1811-1815, July 2003.

ISLA, M. I. et al. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, San Miguel de Tucumán, v. 76, n. 2, p. 165-170, July 2001.

JÚNIOR, O. D. R.; GARCIA, T. C. L. F. Avaliação da qualidade microbiológica de carnes mecanicamente separadas de origem avícola obtidas por dois processos de produção. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Jaboticabal, v. 14, n. 3, p. 133-138, set./dez. 2007.

KAHKONEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, Oct. 1999.

KAHL, R.; HILDEBRANDT, A. G. Methodology for studying antioxidant activity and mechanisms of action of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Richmond, v. 24, n. 10/11, p. 1007-1014, Oct./Nov. 1986.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 153-161, Feb. 2002.

KOLEVA, I. I. et al. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, Wageningen, v. 13, n. 1, p. 8-17, Jan. 2002.

KUBOW, S. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. **Nutrition Reviews**, v. 51, n. 2, p. 33-40, Feb. 1993.

KUEHNE, D.; FREUDENREICH, P.; RISTIC, M. The fatty acid patterns of various animal species. 2. Fats of ruminants, rabbits and chickens. **Fleischwirtschaft**, Frankfurt, v. 66, n. 3, p. 402-405, Mar. 1986.

KUMAGAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAGAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographics origins. **Food Chemistry**, London, v. 84, n. 3, p. 329-339, Feb. 2004.

KUMAR, S.; PEDERSEN – WISMER, J.; CASPERSEN, C. Effect of raw materials deboning methods of chemical additives on microbial quality of mechanically deboned poultry meat during frozen storage. **Journal of Food Science and Technology**, London, v. 23, n. 4, p. 217-220, May 1986.

LAPPE, R. **Influência da utilização do extrato hidroalcóólico de própolis sobre o desenvolvimento de fungos e características físico-químicas e sensoriais do salame tipo italiano**. 2004. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

LAWRIE, R. A. **Meat science**. Lancaster: Technomic, 1998. 336 p.

LEE, L.; CHEN, Y.; CHOU, C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Taipei, v. 102, n. 2, p. 213-220, July 2003.

LEE, Y. B. et al. Mechanism of lipid oxidation in mechanically deboned chicken meat. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 40, n. 5, p. 964-967, May 1975.

LÍRIO, V. S. et al. Frequência de 17 sorotipos de *Salmonella* isoladas em alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 55, p. 36-42, maio/jun1998.

LIVINGSTON, D. J.; BROWN, W. D. The chemistry of myoglobin and its reactions. **Food Technology**, Chicago, v. 35, n. 5, p. 244-252, May 1981.

MACARI, A. J.; SANTOS, A. P. R. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba: MCT/CNPq/PADCT, 2000.

MACNEIL, J. H.; DIMICK, P. S.; MAST, M. G. Use of chemical compounds and rosemary spice extract in quality maintenance of deboned poultry meat. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 38, n. 6, p. 1080-1081, Aug. 1973.

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

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

MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 50, n. 1, p. 5-18, ene. 2000.

MEAD, G. C. Microbiological quality of poultry meat: a review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Champaign, v. 6, n. 3, p. 135-142, Mar. 2004.

MEECH, M.; KIRK, R. Chemical characterization of mechanically recovered meats. **Journal of the Association of Public Analysts**, v. 24, n. 1, p. 13-26, 1986.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 1-11, jan./jun. 2002.

- MENDES DA SILVA, J. F. et al. Correlation analysis between phenolic level of Brazilian propolis extracts and their antimicrobials and antioxidants activities. **Food Chemistry**, London, vol. 99, n. 3, p. 431-435, 2006.
- MILANI, L. I. G. et al. Antioxidantes e antimicrobianos naturais para carne mecanicamente separada de frango. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 4., 2001, CAMPINAS. **Anais...** Campinas, 2001. p.122.
- MILANI, L. I. G. et al. Inibição natural da oxidação lipídica na carne mecanicamente separada de frango. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS, 18., 2002, PORTO ALEGRE. **Anais...** Porto Alegre, 2002a.
- MILANI, L. I. G. et al. Natural antioxidants for mechanically deboned chicken meat. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 48., 2002, ROME. **Proceedings...** Roma, 2002b.
- MIORIN, P. L. et al. Anti-bacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustia* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 913-920, Nov. 2003.
- MITSUMOTO, M. et al. Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. **Meat Science**, Barking, v. 69, n. 4, p. 773-779, Apr. 2005.
- MORRISSEY, P. A. et al. Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, Barking, v. 49, p. S73-S86, 1998. supl.
- MOTTA, M. R. A.; BELMONT, M. A. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializadas em supermercados da região Oeste de São Paulo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 78/79, p. 59-62, nov./dez. 2000.
- MUKAI, F. H.; GOLDSTEIN, D. B. Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. **Science**, New York, v. 191, p. 868, 1976.
- NAGAI, T. et al. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. **Food Chemistry**, London, v. 75, n. 2, p. 237-240, Nov. 2001.
- NAGAI, T. et al. Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. **Food Chemistry**, London, v. 97, n. 2, p. 256-262, July 2006.

NAKACHI, K. et al. Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients. **Japanese Journal of Cancer Research**. Saitama, v. 89, n. 3, p. 254-261, Aug. 1998.

NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. P. (Org.). **Food Chemistry**, 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 225-319.

NEGRÃO, C. C. et al. Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein quality. **Food chemistry**, London, v. 90, n. 4, p. 579-583, May 2005.

NEWMANN, P. B. The separation of meat from bone: a review of the mechanics and the problems. **Meat Science**, Barking, v. 5, n. 2, p. 171-200, Feb. 1981.

NEWMANN, P. B. **The mechanical recovery of meat: a new look at the technology. Upgrading wastes for feeds and food**. London: Food Research Institute Bristol, 1983, p. 93-114. (IFR-BL Memoir n. 1089).

NICKI, E. et al. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Osaka, v. 336, n. 1, p. 1-9, Dec. 2005.

NORNBERG, J. L. et al. Aproveitamento de subprodutos: resíduo ósseo da CMS. In: CURSO DE TECNOLOGIA DE PRODUTOS CÁRNEOS, 1994, Santa Maria. **Aproveitamento de subprodutos: resíduo ósseo de CMS**. Santa Maria:UFSM, 1994.

NUNES, P. T. **Efeito da pré-cura na estabilidade microbiológica da carne mecanicamente separada e elaboração de um produto reestruturado de filés de peito de galinhas de descarte**. 2003. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

NURMI, E.; RING, C. Production of hygienically justifiable mechanically recovered meat. **Fleischwirtschaft International**, Frankfurt, v. 2, n. 1, p. 21-22, Jan/Apr.1999.

OETTERER, M.; D'ARCE, M. A. B. R.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**, Barueri: Manole, 2006.

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

OHTAKE, Y. Fatty acid distribution in chicken bone marrow lipids. **Nippon Eiyo, Shokuryo Gakkaishi**, Tokyo, v. 36, n. 2, p. 119-121, Feb. 1983.

OLIVO, R. **Carne PSE em aves**. 1999. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

OLIVO, R. et al. **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**, São Paulo: Varela, 2006. 230 p.

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

OSTOVAR, K.; MACNEIL, J. H.; O'DONNELL, K. Poultry product quality. 5. Microbiological evaluation of mechanically deboned poultry meat. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 36, n. 6, p. 1005-1007, Nov./Dec.1971.

OYAIZU, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. **Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307-315, 1986.

PADILHA, A. D. G. **Antioxidante natural na conservação da carne de frango in vivo**. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

PARDI, M. C. et al. **Ciência, higiene e tecnologia da carne: tecnologia da carne e subprodutos, processamento tecnológico**. Goiânia: UFG, 1993. 1110 p.

PARK, Y. K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 313-318, ago. 1998.

PEARSON, A. M. et al. Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. **Food Technology**, Chicago, v. 37, n. 1, p. 121, Jan. 1983.

PEREIRA, M. G. **Iridescência em carne suína fresca**. 2002, 34 f. Monografia (Especialização em Ciência dos Alimentos) - Universidade do Contestado, Concórdia.

POKORNÝ, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science and Technology**, London, v. 2, n. 9, p. 223-227, Sept.1991.

POKORNÝ, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical applications**. Cambridge: CRC Press LLC and Woodhead Publishing, 2001, p. 1-373.

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

PORTER, W. L.; BLACK, E. D.; DROLET, A. M. Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 37, n. 3, p. 615-624, May 1989.

PORTER, W. L. Paradoxical behaviour of antioxidants in food and biological systems. **Toxicology and Industrial Health**, Washington, v. 9, n. 1-2. p. 93-122, Jan./Apr. 1993.

PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, K. A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, North Carolina, v. 30, n. 4, p. 277-290, Apr. 1995.

PRATT, D. E.; BIRAC, P. M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **Journal Food Science**, Chicago, v. 44, n. 3, p. 1720-1722, Mar. 1979.

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

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 of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 12, p. 2182-2185, Dec. 1992.

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

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. São Paulo: Instituto Mauá de Tecnologia; E. Blucher, 2004.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, Lyon, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Science.**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 304-309, Apr. 1997.
RIZVI, S. S. H. Requirements for foods packaged in polymeric films. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, West Palm Beach, v. 14, n. 2, p. 111-134, Feb. 1981.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, London, v. 92, n. 2, p. 235-254, June 2005.

ROQUE, F. V. **Aproveitamento de Resíduos de Carne de Frango: Uma Análise Exploratória**. 1996. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em: <http://www.eps.ufsc.br/disserta96/vania/intro/intro.htm#lista> Acesso em: 21 de agosto de 2007.

SABU, M. C.; SMITHA, K.; KUTTAN, R. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 83, n. 1-2, p. 109-116, Nov. 2002.

SAFFARI, Y.; SADRZADEH, S. M. H. Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. **Life Sciences**, Elmsford, v. 74, n. 12, p. 1513-1518, Feb. 2004.

SCHELLER, S.; WILCZOK, T.; IMILSKI, S. Free radical scavenging by ethanolic extracts of propolis. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 57, n. 3, p. 461- 465, 1990.

SCHWARZ, K. et al. Investigation of plants extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. **European food research and technology**, Berlin, v. 212, n. 3, p. 319-328, Feb. 2001.

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

SHAMBERGER, R. J.; ANDREONE, T. L.; WILLIS, C. E. Antioxidants and cancer. IV. Malonaldehyde has imitating as a carcinogenic. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 53, n. 6, p. 1771, Dec. 1974.

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

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**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, jan./mar. 1999.

SILVEIRA, E. T. F. **Produção de carne de frango mecanicamente separada**. CTC/ITAL, 1994.

SIMÕES, C. M. O. et al. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., composital. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 22, n. 3, p. 281-293, Dec. 1988.

SINI, H.; DEVI, K. S. Antioxidant activities of chloroform extract of *Solanum trilobatum*. **Pharmaceutical Biology**, Thiruvananthapuram Kerala, v. 42, , n. 6, p. 462-466, Sept. 2004.

SOARES, N. P. **Efeito do tratamento pós-salga com própolis sobre o desenvolvimento de fungos e características físico-químicas e sensoriais do queijo minas padrão**. 2004. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

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

SOUSA, A. E.; TEIXEIRA, V. C. L.; MELLO, M. R. P. A. et al. Aplicação de redes neurais para a avaliação do teor de carne mecanicamente separada em salsicha de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 307-311, jul./set. 2003.

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

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

SOUZA, M. A. de A.; TERRA, N. N. Antioxidant activities of sesame seed extracts in chicken thighs. **Fleischwirtschaft International**, Frankfurt, v. 23, n. 1, p. 75-78, Jan./Apr. 2008.

STEWART, M. R.; ZIPSER, M. W.; WATTS, B. M. The use of reflectance spectrophotometry for the assay of raw meat pigments. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 30, p. 464-469, 1965.

SUN, A. Y.; SIMONYL, A.; SUN, G. Y. The “French Paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. **Free Radical Biology and Medical**, Chapel Hill, v. 32, n.4, p. 314-318, Feb. 2002.

TANG, S. Z.; KERRY, J. P.; SHEEHAN, D.; BUCKLEY, D. J. Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. **Food Chemistry**, London, v. 76, n. 1, p. 45-51, Jan. 2002.

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

TERRA, N. N. et al. Antioxidante natural na melhoria da qualidade do salame tipo italiano. In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2., 2003, FLORIANÓPOLIS. **Anais...** Florianópolis, 2003.

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

TRINDADE, M. A.; FELÍCIO, P. E. de; CASTILLO, C. J. C. Mechanically separated meat of broilers breeder and white layer spent hens. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 61, n. 2, p. 234-239, mar./abr. 2004.

TRINDADE, M. A. et al. Estabilidade oxidativa e microbiológica em carne de galinha mecanicamente separada e adicionada de antioxidantes durante período de armazenamento a -18°C. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 160-168, jan./mar. 2008.

TSALIKI, E.; LAGOURI, V.; DOXASTAKIS, G. Evaluation of the antioxidant activity of lupin seed flour and derivatives (*Lupinus albus ssp.* Graecus). **Food Chemistry**, London, v. 65, n. 1, p. 71-75, Apr. 1999.

UESATO, S. et al. Inhibition of green tea catechins against the growth of cancerous human colon and hepatic epithelial cells. **Cancer Letters**, Tokushima, v. 170, n. 1, p. 41-44, Jan. 2001.

VIEIRA, C. R. N.; TEIXEIRA, C. G. Condições higiênico-sanitárias de carcaças resfriadas de frango comercializadas em Poços de Caldas-MG. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 48, p. 36-40, mar./abr. 1997.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chemistry**, London, v. 63, n. 3, p. 335-342, Nov. 1998.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 44, n. 3, p. 701-705, Mar. 1996.

WINGE, H. et al. **Erva-mate**: biologia e cultura no Cone Sul. Porto Alegre: Editora da Universidade/ UFRGS, 1995. p. 356.

WÜRTZEN, G. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology**, Oxford, v. 28, n. 11, p. 743-745, Nov. 1990.

XAVIER, C. V. A.; BERAQUET, N. J. Vida-de-prateleira da carne mecanicamente separada de frango estocada sob refrigeração. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 91-104, 1994.

YANG, A. et al. Warmed-over flavor and lipid stability of beef: effects of prior nutrition. **Food and Chemical Toxicology**, Richmond, v. 67, n. 9, p. 3309-3313, Sept. 2002.

YILMAZ, Y. Novel uses of catechins in foods. **Trends in Food Science & Technology**, Amherst, v. 17, n. 3, p. 64-71, Mar. 2006.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, London, v. 64, n. 4, p. 555-559, Mar. 1999.

ZHONG, Z. et al. Polyphenols from *Camellia sinensis* prevent primary graft failure after transplantation of ethanol-induced fatty livers from rats. **Free Radical Biology and Medicine**, Chapel Hill, v. 36, n. 10, p. 1248-1258, May 2004.