

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS
QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS**

LEILA FERNANDA SERAFINI

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE MANJERONA E
PÓLEN APÍCOLA: EFEITOS NA QUALIDADE DE HAMBÚRGUER**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2013

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS
QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

LEILA FERNANDA SERAFINI

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE MANJERONA E
PÓLEN APÍCOLA: EFEITOS NA QUALIDADE DE HAMBÚRGUER**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO
2013

LEILA FERNANDA SERAFINI

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE MANJERONA E
PÓLEN APÍCOLA: EFEITOS NA QUALIDADE DE HAMBÚRGUER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Linha de Pesquisa: Química de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Solange Teresinha Carpes.

Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Adriana Pizarro Schmidt.

PATO BRANCO
2013

S481a Serafini, Leila Fernanda.
Atividade antioxidante dos extratos de manjerona e pólen apícola:
efeitos na qualidade de hambúrguer / Leila Fernanda Serafini. -- 2013.
136 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Profa. Dra. Solange Teresinha Carpes
Coorientador: Profa. Dra. Carla Adriana Pizarro Schmidt
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e
Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2013.
Bibliografia: f. 109 – 130.

1. Antioxidantes naturais. 2. Compostos fenólicos. 3. Oxidação lipídica. I.
Carpes, Solange Teresinha, orient. II. Schmidt, Carla Adriana Pizarro,
coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de
Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV.
Título.

CDD (22. ed.) 660.281

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



TERMO DE APROVAÇÃO Nº 3

Título da Dissertação

**Atividade Antioxidante dos Extratos de Manjerona e Pólen Apícola: Efeitos na
Qualidade de Hambúrguer**

Autora

Leila Fernanda Serafini

Esta dissertação foi apresentada às 14 horas do dia 31 de julho de 2013, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de Pesquisa Química de Alimentos – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Prof.^a Dra. Solange Teresinha Carpes – UTFPR
Orientadora

Prof.^a Dra. Cleusa Ines Weber – UTFPR
Examinadora

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar – USP
Examinador

Visto da Coordenação

Prof.^a Dra. Raquel Dalla Costa da Rocha
Coordenadora do PPGTP

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP

Dedico
Aos meus pais Dalcir e Ilva, e ao meu noivo Rodrigo.
Por todo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, pela força, ânimo, coragem e fé para superar dificuldades e por me amparar nos momentos difíceis.

À minha família, em especial meus pais Ilva Beloni Serafini e Dalcir Luiz Serafini, pela educação, por todo apoio, incentivo e por sempre acreditarem em mim, e às minhas irmãs Leidi e Laís pelo carinho.

Ao meu noivo Rodrigo Diego Heldt, pelo amor, paciência, compreensão e companheirismo.

Às minhas afilhadas amadas Maíra e Mirela, por todos os momentos de felicidade.

Ao Sr. Valdir, Dona Clarice e Maiara, pela confiança, apoio e incentivo.

À minha orientadora Profa. Dra. Solange Teresinha Carpes, pela oportunidade, compreensão, confiança, paciência, apoio, profissionalismo, e pela sua contribuição em minha formação científica.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Carla Adriana Pizarro Schmidt, pela confiança, amizade e ajuda na análise sensorial.

À Profa. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, pela amizade, colaboração, pelos conselhos e sugestões.

À Profa. Dra. Elidia Aparecida Vetter Ferri, pela ajuda na utilização do microscópio eletrônico de varredura.

Ao Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk pela realização e colaboração nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência.

Aos professores da UTFPR – Câmpus Medianeira, Valdemar Padilha Feltrin e Cristiane Canan, pela disponibilidade dos laboratórios.

Às professoras doutoras, Carla Schmidt e Tatiane Oldoni por suas importantes contribuições neste trabalho e pela participação no meu Exame de Qualificação.

À Mirelli, Cristiane, Jaqueline, Larissa, Mariéli e Daiane, dedicadas alunas de iniciação científica, pela ajuda preciosa nos experimentos, pela amizade, carinho, companheirismo e incansável disposição em ajudar, pela descontração, conversas e risadas durante as análises.

À Valquíria, e ao casal de amigos de todas as horas, Mirelli e Hugo pela amizade, companheirismo e ajuda no desenvolvimento dos produtos.

À minha companheira de apartamento desses dois anos Patrícia, pela amizade, compreensão e boas conversas.

Aos meus amigos e colegas de mestrado por ter dividido a amizade, alegrias, frustrações, conquistas, pelas experiências compartilhadas, enfim, por todos os momentos passados juntos.

Às técnicas de laboratório/alimentos da UTFPR – Câmpus Francisco Beltrão, pela ajuda na utilização de alguns equipamentos dos laboratórios.

À responsável técnica dos laboratórios de química da UTFPR – Câmpus Pato Branco Edenes Loss, e aos estagiários pela compreensão e empréstimo de equipamentos e materiais.

À Rute Womer pela disponibilidade e apoio técnico na elaboração dos produtos. Agradecimento muito especial.

À CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado.

À indústria Breyer & Cia LTDA pela parceria e fornecimento do pólen apícola.

À empresa FRIMESA pela parceria e fornecimento da matéria prima e ingredientes para produção dos hambúrgueres. Agradecimento especial à Giana do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento pela sua atenção e disponibilidade.

Aos julgadores da análise sensorial.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, e do Departamento de Química da UTFPR - Câmpus Pato Branco, pela aquisição de conhecimentos para a minha formação profissional.

E por fim, a todos aqueles que realmente torceram e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
Abraçar a vida e viver com paixão,
Perder com classe e viver com ousadia,
Pois o triunfo pertence a quem se atreve,
E a vida é muito bela para ser insignificante”.*

(Charles Chaplin)

RESUMO

SERAFINI, Leila Fernanda. **Atividade antioxidante dos extratos de manjerona e pólen apícola: efeitos na qualidade de hambúrguer**. 2013. 136f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR, 2013.

A carne e seus derivados representam uma parte importante da dieta humana. Porém, devido a sua riqueza na composição química são suscetíveis a alterações de ordem físico-química como a oxidação lipídica, tornando necessário o uso de aditivos para sua conservação. A tendência é utilizar produtos naturais como alternativas aos aditivos químicos. Entre os produtos naturais, a manjerona e o pólen apícola apresentam, em sua composição, metabólitos secundários com alta atividade antioxidante. O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades bioativas de dois produtos, pólen apícola orgânico e manjerona (*Origanum majorana L.*), bem como sua aplicação como antioxidantes naturais em hambúrgueres. No pólen apícola desidratado, foi realizada caracterização palinológica e determinação da composição centesimal. O pólen apícola e a manjerona foram extraídos individualmente com etanol 80% em shaker, a 40 °C/60 minutos. Os compostos fenólicos e flavonoides totais dos extratos etanólicos de pólen apícola e manjerona foram quantificados e a identificação feita por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). A atividade antioxidante dos extratos foi determinada e comparada à de antioxidantes comerciais por quatro métodos distintos. Após os extratos serem evaporados e liofilizados, foram aplicados separadamente na concentração de 0,3% em formulações de hambúrgueres de carne bovina, também foi elaborada uma formulação padrão, com 0,01% de butilhidroxitolueno; além da formulação controle, sem antioxidantes. Os hambúrgueres foram caracterizados através da determinação da composição centesimal. A oxidação lipídica foi determinada pelo índice de peróxido a cada 14 dias, e pelo índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) a cada 7 dias. Após avaliação microbiológica foi realizada a análise sensorial. Verificou-se que o pólen apícola foi classificado como heterofloral, com predominância da família *Asteraceae*. Os resultados obtidos na composição centesimal do pólen apícola, com exceção do teor de umidade, estão em conformidade com a legislação brasileira. O extrato de manjerona apresentou o maior teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em relação ao extrato de pólen apícola. Pela técnica de CLAE foi possível identificar e quantificar os flavonoides rutina, miricetina, quercetina e canferol, e os ácidos fenólicos, cafêico, *p*-cumárico, ferúlico e trans-cinâmico. Os extratos apresentaram alta atividade antioxidante *in vitro* pelos quatro métodos avaliados, sendo esta atividade atribuída à presença de compostos fenólicos. Os resultados obtidos para composição centesimal dos hambúrgueres indicam que com exceção do conteúdo de carboidratos, os demais parâmetros estão de acordo com a legislação brasileira. Com relação à oxidação lipídica, não houve a formação de peróxidos em nenhuma formulação, durante todo o período em que os produtos permaneceram congelados. Os extratos de manjerona e pólen apícola demonstraram resultados satisfatórios pelo TBARS, portanto, a concentração de antioxidantes naturais, foi suficiente para

manter a estabilidade oxidativa. Sob os aspectos microbiológicos, os hambúrgueres atenderam à legislação vigente. Os índices de aceitabilidade para a avaliação global foram superiores a 70% para as formulações controle, padrão e adicionada de pólen apícola, no entanto a aplicação de manjerona interferiu negativamente nas características sensoriais.

Palavras-chave: Antioxidantes naturais. Compostos fenólicos. Oxidação lipídica.

ABSTRACT

SERAFINI, Leila Fernanda. **Antioxidant activity of the extracts of marjoram and bee pollen: effects on quality of burger.** 2013. 136f. Dissertation (Master in Technology of Chemical and Biochemical Processes) – Post Graduation Program in Technology of Chemical and Biochemical Processes, Federal University of Technology of Paraná. Pato Branco, PR, 2013.

The meat and its derivatives represent an important part of the human diet. However, due to its richness in chemical composition are susceptible to changes in physical-chemical and lipid oxidation, requiring the use of additives for its preservation. The trend is to use natural products as alternatives to the chemical additives. Among the natural products, marjoram and bee pollen present in its composition, secondary metabolites with high antioxidant activity. The aim of this study was to evaluate the bioactive properties of two products, organic bee pollen and marjoram (*Origanum majorana* L.) and its application as natural antioxidants in burgers. Dehydrated in bee pollen, pollen characterization was performed and determination of chemical composition. The bee pollen and marjoram were individually extracted with 80% ethanol in a shaker at 40 °C/60 minutes. Phenolic compounds and total flavonoid of ethanol extracts of pollen and marjoram were quantified and the identification made by high performance liquid chromatography on reversed phase (HPLC-RP). The antioxidant activity of the extracts was determined and compared to that of commercial antioxidants by four different methods. After the extracts were evaporated and lyophilized, were applied separately at a concentration of 0.3% in formulations of beef burgers, was also drafted a standard formulation with 0.01% butylhydroxytoluene; beyond the control formulation without antioxidants. The burgers were characterized by determining the chemical composition. Lipid oxidation was determined by peroxide value every 14 days, and the rate of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) every 7 days. After microbiological evaluation was performed sensory analysis. It was found that bee pollen was classified as heterofloral, predominantly family *Asteraceae*. The results on the chemical composition of bee pollen, with the exception of moisture content, the other parameters are in accordance with Brazilian law. The extract of marjoram had the highest content of total phenolics and flavonoids in relation to the extract of pollen. By HPLC technique was possible to identify and quantify flavonoids rutin, myricetin, quercetin and kaempferol, and phenolic acids, caffeic, *p*-coumaric, ferulic and trans-cinnamic acid. The extracts showed high antioxidant activity in vitro by the four methods evaluated, this activity being attributed to the presence of phenolic compounds. The results obtained for proximate composition of burgers indicate that with the exception of carbohydrate content, the other parameters are in accordance with Brazilian law. With respect to lipid oxidation, no formation of peroxides in any formulation during the period in which the products remained frozen. The extracts of bee pollen and marjoram demonstrated by the TBARS satisfactory results, therefore, the concentration of natural antioxidants was sufficient to maintain oxidative stability. Under the microbiological aspects, the burgers attended the law. The rate of acceptability for the overall evaluation was above 70% for the control formulations, standard and added bee pollen, however the application of marjoram negative influence on sensory characteristics.

Keywords: Natural antioxidants. Phenolic compounds. Lipid oxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas da oxidação lipídica em alimentos.....	26
Figura 2 - Equações das reações de oxidação e redução na titulação iodométrica.....	28
Figura 3 - Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído formando o composto colorido	29
Figura 4 - Mecanismo de ação de antioxidantes primários	31
Figura 5 - Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos	32
Figura 6 - Pellets de pólen apícola	34
Figura 7 - Manjerona (<i>Origanum majorana</i> L.).....	37
Figura 8 - Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante.....	39
Figura 9 - Redução do ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	41
Figura 10 - Redução do complexo TPTZ com Fe ³⁺	41
Figura 11 - Fluxograma do estudo desde a aquisição das amostras até as análises.....	45
Figura 12 - Fluxograma básico do processamento dos hambúrgueres.....	56
Figura 13 - Apresentação das amostras para análise sensorial	63
Figura 14 - Ficha utilizada para avaliação sensorial	65
Figura 15 - Tipos polínicos observados na amostra de pólen apícola orgânico de União da Vitória, PR	72
Figura 16 - Cromatogramas em CLAE dos extratos de etanólicos de pólen apícola (A) e manjerona (B).....	77
Figura 17 - Exemplo de gráfico para o cálculo do IC ₅₀	80
Figura 18 - Histogramas dos valores obtidos para cor na escala do ideal na avaliação das amostras de hambúrguer	97
Figura 19 - Histogramas dos valores obtidos para odor na escala do ideal na avaliação das amostras de hambúrguer	97
Figura 20 - Histogramas dos valores obtidos para aparência na escala do ideal na avaliação das amostras de hambúrguer	98
Figura 21 - Histogramas dos valores obtidos para sabor na escala do ideal na avaliação das amostras de hambúrguer	98
Figura 22 - Dispersão dos tratamentos de hambúrgueres em relação à aceitação de cada julgador para a avaliação global	103
Figura 23 - Percepção de ranço das amostras pelos julgadores em percentual	105
Figura 24 - Intenção de compra das amostras pelos julgadores em percentual	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites físico-químicos determinados pela legislação para padronização de hambúrguer	23
Tabela 2 - Consumo de produtos cárneos congelados no Brasil em volumes.....	24
Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos e microbiológicos de controle de qualidade de pólen apícola	36
Tabela 4 - Composição centesimal da amostra de pólen apícola orgânico desidratado.....	67
Tabela 5 - Conteúdo mineral da amostra de pólen apícola orgânico desidratado	70
Tabela 6 - Tipos polínicos observados na amostra de pólen apícola orgânico desidratado.....	72
Tabela 7 - Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais do EEM e EEP	74
Tabela 8 - Compostos fenólicos identificados no EEP e EEM por CLAE-FR.....	76
Tabela 9 - Atividade de sequestro do radical DPPH: IC ₅₀ e porcentagem de atividade antioxidante	80
Tabela 10 - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox pelo método ABTS ⁺⁺	82
Tabela 11 - Atividade antioxidante pela redução do ferro (FRAP)	84
Tabela 12 - Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico	86
Tabela 13 - Composição centesimal dos diferentes tratamentos de hambúrguer	87
Tabela 14 - Valores médios de TBARS nos diferentes tratamentos de hambúrguer durante o período de armazenamento	91
Tabela 15 - Caracterização microbiológica dos diferentes tratamentos de hambúrguer	95
Tabela 16 - Médias das notas obtidas na avaliação sensorial dos hambúrgueres através das escalas do ideal e hedônica.....	100
Tabela 17 - Índice de Aceitabilidade (IA) em percentual para a avaliação global de cada tratamento	101
Tabela 18 - Coeficiente de Concordância (CC) em percentual para as propriedades sensoriais de cada amostra.....	102
Tabela 19 - Módulos das diferenças entre os pares da soma total da ordenação da preferência	104

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

A*	Radical inerte
Abs _a	Absorbância da amostra
Abs _b	Absorbância do branco
Abs _c	Absorbância do controle
ABTS ^{•+}	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AH	Antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo
%AA	Atividade Antioxidante (%)
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CC	Coefficiente de Concordância
CLAE/FR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
CP	Componentes principais
DPPH [•]	2,2 difenil-1-picridrazina
DR _c	Taxa de degradação da amostra controle
DR _s	Taxa de degradação da amostra contendo a substância teste
EAG/g	Equivalente em ácido gálico por grama de amostra
EEM	Extrato Etanólico de Manjerona
EEP	Extrato Etanólico de Pólen Apícola
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro
IA	Índice de aceitabilidade
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IC ₅₀	Coefficiente de inibição (concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH [•])
IP	Índice de peróxido

MDA	Malonaldeído
mEq/kg	Miliequivalentes por quilograma de amostra
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OH [•]	Radical hidroxil
PA	Pólen acessório ou secundário
PD	Pólen dominante ou predominante
PG	Galato de propila
PII	Pólen isolado importante
PIO	Pólen isolado ocasional
RH	Ácido graxo insaturado
R [*]	Radical livre
ROO [*]	Radical peróxido
ROOH	Radical hidroperóxido
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBHQ	terc-butilhidroquinona
TPTZ	Tripiridiltriazina
UFC/g	Unidades formadoras de colônia por grama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	PRODUTOS CÁRNEOS	21
3.1.1	Produtos cárneos reestruturados	21
3.1.1.1	Hambúrguer	22
3.2	OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CARNES	24
3.2.1	Métodos para avaliação da oxidação lipídica	27
3.2.1.1	Índice de peróxido.....	27
3.2.1.2	Índice de TBARS.....	28
3.3	ANTIOXIDANTES	30
3.3.1	Antioxidantes naturais	33
3.3.1.1	Pólen apícola	34
3.3.1.2	Manjerona (<i>Origanum majorana L.</i>)	36
3.3.2	Métodos para avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	38
3.3.2.1	Método de sequestro do radical livre DPPH [*]	39
3.3.2.2	Método ABTS.....	40
3.3.2.3	Método FRAP	41
3.3.2.4	Sistema β -caroteno/ácido linoleico	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	MATERIAL	43
4.1.1	Amostra de manjerona	43
4.1.2	Amostra de pólen apícola.....	43
4.1.3	Preparo do Extrato Etanólico de Pólen apícola (EEP)	44
4.1.4	Preparo do Extrato Etanólico de Manjerona (EEM).....	44
4.2	MÉTODOS	45
4.2.1	Composição química do pólen apícola.....	46
4.2.1.1	Atividade de água (A_w).....	46
4.2.1.2	Umidade.....	46

4.2.1.3	Teor de cinzas	47
4.2.1.4	Minerais	47
4.2.1.5	Proteína total.....	47
4.2.1.6	Lipídeos	48
4.2.1.7	Fibras	48
4.2.1.8	Carboidratos	48
4.2.2	Caracterização palinológica do pólen apícola	49
4.2.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	49
4.2.3	Caracterização química do EEM e do EEP	50
4.2.3.1	Determinação de compostos fenólicos totais.....	50
4.2.3.2	Análise de flavonoides totais.....	50
4.2.3.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) ..	51
4.2.4	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do EEP e EEM.....	52
4.2.4.1	Atividade de sequestro do radical DPPH'	52
4.2.4.2	Atividade antioxidante pelo método ABTS ⁺⁺	53
4.2.4.3	Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro - FRAP	54
4.2.4.4	Autooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico	54
4.2.5	Elaboração do produto	55
4.2.6	Composição centesimal dos hambúrgueres.....	57
4.2.6.1	Teor de umidade.....	57
4.2.6.2	Teor de cinzas	57
4.2.6.3	Proteína total.....	57
4.2.6.4	Lipídeos	58
4.2.6.5	Carboidratos totais.....	58
4.2.7	Avaliação da oxidação lipídica	58
4.2.7.1	Índice de peróxido (IP).....	58
4.2.7.2	Índice de TBARS.....	59
4.2.8	Análises microbiológicas dos hambúrgueres	60
4.2.8.1	Coliformes totais e termotolerantes.....	60
4.2.8.2	Estafilococos coagulase positiva	60
4.2.8.3	Contagem de <i>Clostridium</i> sulfito redutor	61
4.2.8.4	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.....	61
4.2.9	Análise sensorial	62
4.2.10	Análise estatística	66

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO PÓLEN APÍCOLA	67
5.2	CARACTERIZAÇÃO PALINOLÓGICA DO PÓLEN APÍCOLA	71
5.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EEM E DO EEP	74
5.3.1	Compostos fenólicos e flavonoides totais do EEM e do EEP	74
5.3.2	Determinação de compostos fenólicos por CLAE-FR	76
5.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EEM E DO EEP	79
5.4.1	Atividade de sequestro do radical DPPH [•]	79
5.4.2	Atividade antioxidante pelo método ABTS ^{•+}	82
5.4.3	Atividade antioxidante através da redução do ferro - FRAP	83
5.4.4	Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico	85
5.5	CARACTERIZAÇÃO DOS HAMBÚRGUERES	87
5.5.1	Composição centesimal	87
5.5.2	Determinação da oxidação lipídica	89
5.5.2.1	Índice de peróxido (IP)	89
5.5.2.2	Índice de TBARS	90
5.5.3	Avaliação microbiológica	94
5.5.4	Análise sensorial	96
6	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS	109
	ANEXOS	131

1 INTRODUÇÃO

A relação entre dieta e saúde está cada vez mais evidente, o consumidor tem manifestado interesse crescente na busca por alimentos mais saudáveis, visando o alcance de uma dieta de melhor qualidade, pois aumenta a preocupação com as consequências que os estilos de vida e seus hábitos alimentares têm sobre a saúde.

A carne e seus derivados representam uma parte importante da dieta humana, é um alimento de alto valor nutritivo, pois sua composição em aminoácidos essenciais, lipídeos, vitaminas e minerais são adequados à alimentação. A industrialização e o processamento de carnes consistem na modificação das propriedades originais da carne fresca, por tratamento físico, químico ou biológico, ou ainda, através da combinação destes que visam o prolongamento da vida útil do produto, mantendo as propriedades nutritivas e organolépticas (PARDI et al., 2006). As carnes provenientes de bovinos são as preferencialmente utilizadas pelas indústrias como matéria-prima. Entre os produtos cárneos congelados destacam-se os hambúrgueres, em virtude de suas características sensoriais positivas e praticidade (QUEIROZ et al., 2005).

Todavia, os produtos cárneos, devido à sua riqueza na composição química, estão propensos à oxidação lipídica, que pode ocorrer tanto no processamento como no armazenamento. A oxidação lipídica é o principal processo pelo qual ocorre perda da qualidade das carnes e seus derivados e um fator determinante na vida útil do produto, na medida em que gera produtos indesejáveis do ponto de vista sensorial. Este processo está relacionado com a produção de substâncias potencialmente tóxicas como o malonaldeído e óxidos de colesterol, e apresenta como consequências, a modificação do *flavor* original, o aparecimento de odor e aroma característicos do ranço e a perda do valor nutricional decorrente da destruição de vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos (ZANARDI et al., 2004; OLIVEIRA, 2011).

Na tentativa de prevenir à deterioração oxidativa, as indústrias alimentícias fazem uso de aditivos sintéticos com propriedades antioxidantes. Entretanto, os antioxidantes sintéticos mais usados como o BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno), TBHQ (terc-butilhidroquinona) e PG (galato de propila) têm

despertado preocupação quanto aos aspectos toxicológicos e efeitos carcinogênicos (SOUSA et al., 2007). Na seleção de antioxidantes, são desejáveis propriedades tais como, a eficácia em baixas concentrações, ausência de efeitos indesejáveis nas características sensoriais do alimento, estabilidade nas condições de processo e armazenamento e não apresentar toxicidade (RAMALHO; JORGE, 2006).

Nesse sentido, a procura por compostos antioxidantes naturais tem recebido maior atenção por parte dos pesquisadores e da indústria de alimentos. Os compostos antioxidantes obtidos de produtos naturais podem não somente aumentar a estabilidade dos alimentos pela inibição da peroxidação lipídica; mas, também ajudam o corpo humano a se proteger contra os danos causados pelas espécies reativas ao oxigênio, associadas com doenças degenerativas (SHAHIDI; NACZK, 2005).

Entre os produtos naturais, o pólen apícola vem se destacando tanto pelas suas propriedades biológicas como atividade antioxidante, quanto pelo seu valor nutritivo, com possibilidade de aplicação na indústria alimentícia (GRAIKOU et al., 2011). Assim como o pólen, as ervas aromáticas, em especial a manjerona (*Origanum majorana* L.) também se destaca por possuir substâncias bioativas, e especialmente porque os extratos desta planta exibem atividade antioxidante em baixas concentrações (BUSATTA et al., 2008). Os efeitos benéficos têm sido atribuídos aos diversos compostos fenólicos presentes nesses produtos (DEL RIO et al., 2010).

A maioria dos antioxidantes, incluindo compostos fenólicos possui uma base molecular semelhante, ou seja, pelo menos um anel aromático e um grupo hidroxila, incluindo os ácidos fenólicos, os flavonoides, entre outros. Juntos, estes compostos produzem um arranjo de antioxidantes que pode agir por diferentes mecanismos para conferir um sistema de defesa efetivo contra o ataque dos radicais livres (SHAHIDI; NACZK, 2005).

Devido à tendência pela procura de produtos naturais pelos consumidores, causada pela crescente preocupação com a saúde, tornam-se necessários maiores estudos sobre a aplicação de pólen apícola e manjerona, como antioxidantes naturais em alimentos, em substituição aos convencionais sintéticos amplamente utilizados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades bioativas de dois produtos, pólen apícola orgânico e manjerona (*Origanum majorana* L.), bem como sua aplicação como antioxidantes naturais em hambúrgueres de carne bovina, como alternativa aos aditivos químicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a composição centesimal do pólen apícola orgânico (atividade de água, umidade, cinzas, minerais, proteínas, lipídeos, fibras e carboidratos);
- b) Identificar os tipos polínicos presentes na amostra de pólen apícola orgânico;
- c) Avaliar a composição química dos extratos etanólicos de pólen apícola e manjerona por meio de cromatografia líquida de alta eficiência;
- d) Determinar os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais nos extratos etanólicos de manjerona e pólen apícola;
- e) Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos etanólicos de pólen apícola e manjerona por diferentes métodos: sequestro do radical livre DPPH[•], captura do radical ABTS^{•+}, clareamento do sistema β -caroteno/ácido linoleico e atividade redutora do ferro – FRAP;
- f) Formular e produzir diferentes tratamentos de hambúrguer de carne bovina, utilizando como antioxidantes naturais, os extratos de pólen apícola e manjerona separadamente, um tratamento padrão com o antioxidante sintético BHT e um tratamento controle, sem antioxidantes;
- g) Caracterizar os hambúrgueres elaborados quanto à composição centesimal (umidade, cinzas, proteína, lipídeos e carboidratos);
- h) Avaliar o efeito dos extratos na estabilidade oxidativa dos produtos elaborados, comparando-os com os tratamentos padrão e controle, através

de análises como índice de peróxido e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS;

- i) Analisar os diferentes tratamentos de hambúrguer, quanto aos parâmetros de qualidade, por meio de análises microbiológicas;
- j) Verificar a interferência dos extratos nas características sensoriais, e o nível de aceitação dos consumidores em potencial para os hambúrgueres formulados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUTOS CÁRNEOS

Evidências arqueológicas indicam que os seres humanos têm utilizado produtos de origem animal, incluindo a carne, como fonte de alimentos por milhares de anos. Nos últimos anos, o grande apelo sensorial e a saciedade proporcionada pelo consumo de carnes e seus derivados, faz com que esses produtos tenham destaques nas dietas do mundo todo (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Há milhares de anos, apesar de o homem desconhecer os micro-organismos, ele sabia que os alimentos deterioravam se não fossem consumidos rapidamente. Assim, como forma de ampliar a vida útil das carnes frescas, passou-se a transformá-las em produtos cárneos (TERRA, 2006; ORDÓÑEZ PEREDA et al., 2005).

Consideram-se produtos e derivados cárneos aqueles alimentos preparados total ou parcialmente com carnes, miúdos ou gorduras e subprodutos comestíveis, procedentes de animais de abate e de outras espécies e, eventualmente, com ingredientes de origem vegetal ou animal, e ainda com condimentos, especiarias e aditivos, desde que sejam autorizados (ORDÓÑEZ PEREDA et al., 2005). Esses ingredientes, em conjunto com a aplicação de tratamentos físicos e térmicos envolvem grandes modificações físico-químicas na carne fresca, proporcionando o aumento da sua vida útil, o desenvolvimento de diferentes sabores e a agregação de valor (TERRA, 1998). A necessidade de cada região, com condições climáticas e costumes culturais diferentes, levou a diversificação e classificação de produtos, com sabores e texturas característicos.

3.1.1 Produtos cárneos reestruturados

Na indústria de carnes, os elevados custos de produção estimulam o estudo e o desenvolvimento de novas tecnologias visando à utilização de todas as partes do

animal com objetivo de minimizar as perdas e maximizar o lucro das empresas. Isso inclui a implementação de métodos de reestruturação de carnes com aparas e cortes de baixo valor comercial para melhorar a aparência e textura do novo produto (FERREIRA et al., 2012).

Com os processos de reestruturação de carnes, é possível elaborar produtos de qualidade considerável a partir de porções de carne com textura deficiente, de difícil comercialização e de baixo valor comercial, oferecendo um produto com maior qualidade e preços baixos (NASSARL et al., 2012).

Os produtos cárneos reestruturados (hambúrguer, almondega, quibe e bife reconstituído) possuem uma alta demanda devido à facilidade de utilização, menor preço e conveniência. Entretanto, o produto reestruturado cru deve ser conservado congelado. Além da estabilidade do produto, a indústria busca produzir carnes reestruturadas que possam competir com músculos íntegros em relação às características sensoriais como aparência, odor, sabor e textura, importantes para aceitação pelo consumidor (FERREIRA et al., 2012). Esta tecnologia permite ainda oferecer produtos com qualquer forma ou tamanho, podendo assim diversificar a oferta, e, sobretudo, a possibilidade de incorporação de outros alimentos ou compostos que os tornam mais saudáveis, nutritivos e atrativos (MENDES, 2011).

3.1.1.1 Hambúrguer

Dentre os produtos industrializados de carne, o hambúrguer é uma alternativa para o aproveitamento das carnes menos nobres, o que vem aumentar o lucro dos abatedouros. Os hambúrgueres congelados quase prontos para o consumo têm sido visto como hábito alimentar da população brasileira e de outros países, em virtude de suas características sensoriais positivas e por ser um produto de fácil preparo e apresentar teor de lipídios, proteína de alto valor biológico, vitaminas e minerais em sua composição (QUEIROZ et al., 2005).

De acordo com a Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000, (BRASIL, 2000) entende-se por hambúrguer o produto cárneo industrializado obtido da carne moída dos animais de açougue, adicionado ou não de tecido adiposo e ingredientes, moldado e submetido a processo tecnológico adequado. Trata-se de

um produto cru, semi-frito, cozido, frito, congelado ou resfriado. Na Tabela 1 constam os valores quanto à composição que devem ser respeitados, segundo a legislação vigente.

Tabela 1 - Limites físico-químicos determinados pela legislação para padronização de hambúrguer

Parâmetro	Limite
Gordura (máx.)	23%
Proteína (mín.)	15%
Carboidratos totais	3%
Teor de cálcio (máx. base seca)	0,1% (hambúrguer cru) 0,45% (hambúrguer cozido)
CMS (máx.)	30% (apenas hambúrguer cozido)
Proteína não-cárnica agregada (máx.)	4,0%

Fonte: BRASIL, 2000.

O produto deve ter como ingrediente obrigatório carne de diferentes espécies de animais de açougue (BRASIL, 2000). Segundo Hoogenkamp (1996), os mais populares são os hambúrgueres de carne bovina, com consumo estimado em cerca de 50% do consumo total mundial de carne bovina. Os ingredientes opcionais incluem gorduras animal, vegetal, água, sal, proteínas, leite em pó, açúcares, maltodextrina, aditivos intencionais, condimentos, aromas e especiarias, além de vegetais, queijos e outros recheios (BRASIL, 2000). O acondicionamento deve ser em embalagem com materiais adequados para as condições de armazenamento e que confirmam proteção apropriada ao hambúrguer (BRASIL, 2000).

Nos últimos anos, os hábitos alimentares da população sofreram alterações motivadas pelos processos de urbanização, industrialização e diminuição do tempo disponível para a preparação ou consumo de alimentos. Assim, a procura por alimentos semi-prontos cresceu rapidamente nos últimos anos devido sua conveniência, praticidade e facilidade no preparo. Entre estes alimentos, os produtos derivados da carne bovina são os mais populares, tais como os hambúrgueres que responde por cerca de 40% destes produtos (NASCIMENTO; OLIVEIRA; NASCIMENTO, 2005).

O consumo nacional de hambúrguer congelado tem sido superior, em volume, ao de outros produtos cárneos congelados (MARQUES, 2007), como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Consumo de produtos cárneos congelados no Brasil em volumes

Produtos	(%)
Hambúrgueres	40,2
<i>Nuggets</i>	21,7
<i>Steak</i>	18,7
Cortes	9,9
Outros	5,2
Almondegas	2,2
Quibes	2,1

Fonte: MARQUES (2007)

3.2 OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CARNES

Os lipídeos são importantes componentes dos produtos cárneos, conferindo características sensoriais desejáveis. Mas por outro lado, são facilmente oxidáveis, levando a rancificação com produção de substâncias indesejáveis, o que compromete a validade e qualidade do produto final (OLIVO, 2006). Os lipídios dos produtos cárneos são constituídos de uma mistura de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídios, glicolipídios, esteróis e outras substâncias lipossolúveis. Desses constituintes, muitos são oxidáveis em diferentes graus, contudo, os ácidos graxos insaturados são os constituintes mais suscetíveis ao processo oxidativo. Estima-se que o ácido linoleico (18:2) seja de 10 a 40 vezes mais suscetível à oxidação que o ácido oleico (18:1) (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A oxidação lipídica pode ser acelerada pelo processamento da carne e também na estocagem, corte e cozimento, os quais rompem as membranas do músculo, facilitando a interação dos ácidos graxos insaturados com substâncias pró-

oxidantes. A presença de hemoglobina, mioglobina, citocromo C, ferro não heme e metais de transição aceleram a oxidação lipídica, e conseqüentemente é um fator limitante na qualidade e aceitabilidade do produto (ARAÚJO, 2008). O ferro e os demais metais de transição presentes na composição podem reagir com radicais livres formando o radical hidroxil (OH^\bullet), altamente reativo. Esse radical provoca danos em proteínas, ácidos nucléicos e retira o hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados (GRAF et al., 1987 *apud* WEBER, 2012).

Dessa forma, a oxidação desses componentes, é uma das causas primárias da deterioração da cor, textura e sabor da carne fresca, congelada ou cozida (LIU; LANARI, SCHAEFER, 1995). O processo oxidativo pode provocar a formação de substâncias, com efeito, potencialmente citotóxico, carcinogênico e mutagênico como o MDA e óxidos de colesterol, com possível perda do valor nutricional decorrente da destruição de vitaminas e ácidos graxos essenciais (ZANARDI et al., 2004). Outros produtos da oxidação lipídica que também podem ser gerados são as cetonas, aldeídos, álcoois, ácidos e hidrocarbonetos responsáveis pelo odor e gosto característico de ranço (OLIVO, 2006). Os lipídios podem ser oxidados de diferentes formas, em função do meio e dos agentes catalisadores, os mecanismos mais conhecidos são a oxidação por enzimas, fotoxidação e autoxidação (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

A oxidação enzimática ocorre pela ação das enzimas lipoxigenases, as quais atuam sobre os ácidos graxos poliinsaturados, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poliinsaturada. Os produtos iniciais consistem de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

O mecanismo de fotoxidação de gorduras insaturadas é promovido pela radiação ultravioleta em presença de compostos como a mioglobina que absorve a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e a transferem para o oxigênio tripleto ($^3\text{O}_2$), gerando o estado singleto ($^1\text{O}_2$). Este reage diretamente com as duplas ligações formando hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência de luz, e que por degradação posterior originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (ARAÚJO, 2008).

Na oxidação em alimentos o mecanismo é a autoxidação, que está associada à reação de oxigênio com ácidos graxos insaturados e ocorre em três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação (Figura 1) (RAMALHO; JORGE, 2006).

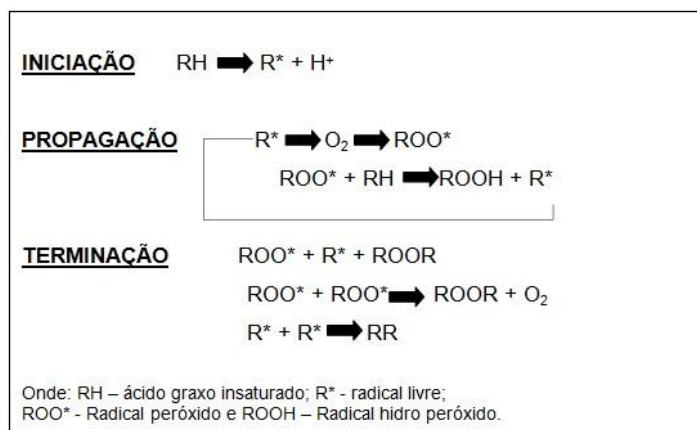


Figura 1 - Etapas da oxidação lipídica em alimentos
 Fonte: Ramalho; Jorge (2006).

Na iniciação, um radical livre, R*, é formado por ação dos agentes oxidantes, que promovem a abstração de um átomo de hidrogênio da molécula de um ácido graxo em condições favorecidas pela luz e calor. Assim o radical livre (R*) reage rapidamente com o oxigênio formando um radical peróxido (St. ANGELO, 1996). Nesta fase, não ocorrem alterações sensoriais e aumenta a concentração de radicais livres (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

Na etapa de propagação, os radicais livres R* formados na iniciação, são convertidos em outros radicais, formando o radical peróxido, este, por sua vez, reage com um ácido graxo livre produzindo hidroperóxidos, como produtos primários da reação obtêm-se os radicais peróxidos (ROO*) e hidroperóxidos (ROOH) enquanto sua concentração cresce rapidamente. Nesta fase tornam-se perceptíveis o odor e sabor de ranço, os quais tendem a aumentar rapidamente provocado pelos produtos de decomposição dos hidroperóxidos (PERSON et al., 1977 *apud* WEBER, 2012).

A propagação só cessa com a etapa de terminação, que é o estágio onde ocorre a interrupção das reações devido à redução de ácidos graxos insaturados no sistema, fazendo com que os radicais livres liguem-se entre si formando compostos estáveis. Esses compostos formados são os produtos secundários de oxidação, obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis) (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). Nesta fase é perceptível intenso odor e sabor de ranço, alterações na cor dos produtos e em sua textura. A etapa de terminação é a mais crítica, por ocasião do processamento, manuseio, moagem, trituração, cozimento e estocagem, determinando o rompimento da membrana

celular, potencializado pela adição de água, adição de sal, temperatura, liberação de ferro e presença de oxigênio (OLIVO, 2006).

A estabilidade das carnes e derivados é um fator limitante nas indústrias, produtores, distribuidores e consumidores. Portanto, inibir a oxidação lipídica nos produtos cárneos é uma alternativa para garantir atributos como sabor, cor, textura e valor nutritivo. A estabilidade oxidativa da carne depende do equilíbrio entre antioxidante e composição dos substratos de oxidação, incluindo ácidos graxos poliinsaturados, colesterol, proteínas e pigmentos (WEBER, 2012).

Medidas de controle para a minimização da oxidação lipídica devem ser sempre aplicáveis, como a remoção do oxigênio, inativação das enzimas, proteção contra a luz e íons metálicos, ou a adição de antioxidantes (BRUM, 2009).

3.2.1 Métodos para avaliação da oxidação lipídica

Vários testes têm sido desenvolvidos para indicar a rancidez oxidativa. Os estágios de rancidez podem ser detectados por estes testes antes que se perceba sensorialmente.

3.2.1.1 Índice de peróxido

O índice de peróxido é um dos métodos mais utilizados para medir o estado de oxidação de óleos e gorduras. Esse parâmetro representa o conteúdo total de hidroperóxidos e peróxidos de hidrogênio formados nos estágios iniciais da oxidação, assim toda gordura oxidada dá resultado positivo nos testes de peróxidos (CECCHI, 1999). O termo mais apropriado seria índice de hidroperóxido, já que estes participam da reação quantitativamente, enquanto peróxidos reagem apenas parcialmente (POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2005).

A determinação da quantidade dos hidroperóxidos, geralmente, é realizada pelo método iodométrico, técnica simples e rápida. Este método é baseado na

redução do grupo hidroperóxido (ROOH) com o íon iodeto (I^-). A quantidade de iodo (I_2) liberada é proporcional à concentração de peróxido presente. O I_2 liberado é determinado por titulação pelo uso de solução padrão de tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) e amido como indicador. As equações representadas na Figura 2 mostram as reações químicas envolvidas na determinação do índice de peróxido (IP) (VOGEL, 1992).

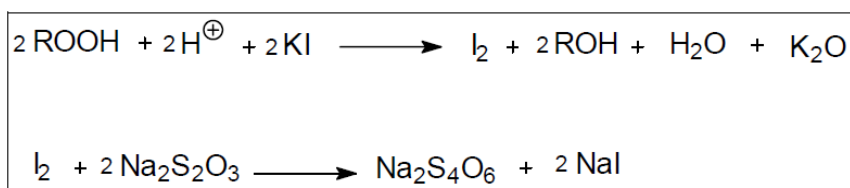


Figura 2 - Equações das reações de oxidação e redução na titulação iodométrica
Fonte: Vogel (1992).

O uso de solventes orgânicos e de amostra em altas quantidades é uma desvantagem da titulação iodométrica. As principais fontes de erro do método são a absorção de iodo, pelas instaurações dos ácidos graxos, e a liberação de iodo do iodeto de potássio, pela presença de oxigênio na solução a ser titulada. Além disso, os produtos medidos são muito instáveis e o método é muito sensível à temperatura ambiente. Não é indicado o uso deste método onde é baixa a concentração dos peróxidos, isso devido à dificuldade de determinação do ponto final da titulação (VOGEL, 1992).

3.2.1.2 Índice de TBARS

Entre as metodologias analíticas disponíveis para acompanhar e compreender o processo de oxidação lipídica em alimentos destaca-se a quantificação das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS).

O método permite quantificar no alimento o grau de oxidação lipídica, visto que seus produtos primários constituem-se principalmente de hidroperóxidos, os quais são rapidamente decompostos em várias substâncias dentre elas o malonaldeído (MDA) que reage com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formando um complexo cromogênio (Figura 3) (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005).

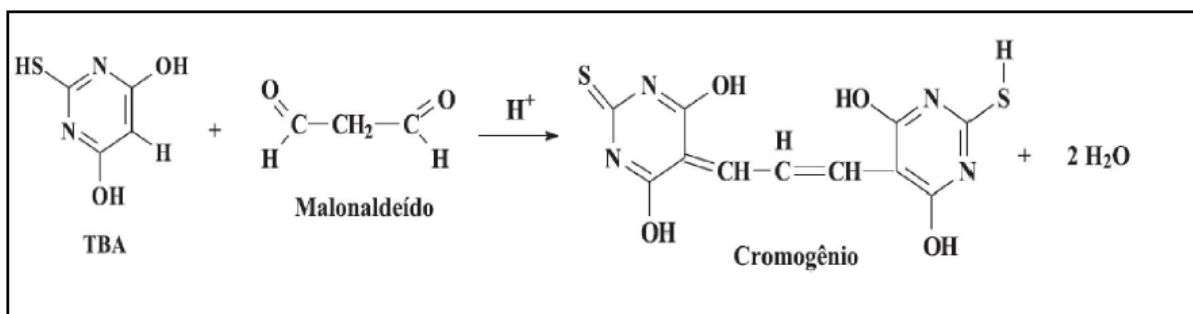


Figura 3 - Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído formando o composto colorido

Fonte: Osawa; Felício; Gonçalves (2005).

As substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico são preferencialmente formadas a partir da clivagem de ácidos graxos com duplas ligações. Os hidroperóxidos formados podem originar compostos contendo grupamentos carbonílicos, sendo o MDA o principal alcadienal relacionado com o processo de oxidação lipídica (MIYAGUSKU et al., 2007).

O MDA é um dialdeído de três carbonos com grupos carbonila nos carbonos C-1 e C-3. Este composto é formado a partir da decomposição de hidroperóxidos, da oxidação secundária de compostos carbonílicos e da degradação oxidativa de aminoácidos ferro-dependentes (OSAWA; FELICIO; GONÇALVES, 2005).

A reação envolve o ácido 2-tiobarbitúrico com o MDA, que com o aquecimento produz coloração vermelha se a gordura estiver oxidada. O método torna-se quantitativo se medido espectrofotometricamente a 532 nm, esse comprimento de onda pode variar, situando-se ao redor de 500 a 550 nm. O teste de TBARS só pode ser corretamente aplicado nos primeiros estágios da oxidação, porque nos estágios mais avançados vai haver muita modificação nos compostos produzidos. A cor produzida varia com o tipo de ácidos graxos existentes na amostra. O pigmento produzido na reação colorimétrica é resultante da condensação de duas moléculas de TBA e uma de dialdeído malônico (CECCHI, 1999).

Os resultados são expressos em unidades de absorvância por unidade de massa de amostra ou em “valor de TBA” ou “número de TBA”, definidos como a massa, em mg de malonaldeído por kg de amostra. Particularmente para carnes e derivados, a informação do número de TBARS é bastante relevante. Processos envolvidos na elaboração de produtos cárneos que incluam moagem,

homogeneização (mistura) e cozimento favorecem a formação do MDA, sendo fundamental o emprego do teste na avaliação da qualidade do produto final (BRUM, 2009).

3.3 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de diminuir ou prevenir significativamente a oxidação de outra substância, sempre que presente em menor concentração quando comparado a substância oxidável de interesse (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Outra definição é o de antioxidantes em alimentos, como uma substância que em pequena quantidade é capaz de prevenir ou retardar grandemente a oxidação de materiais facilmente oxidáveis, como as gorduras (BECKER et al., 2004).

Os antioxidantes podem ser considerados um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas, que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres (MESSIAS, 2009). De acordo com Ali et al. (2008), estas substâncias ajudam o organismo a combater o estresse oxidativo, causado nas células pelos radicais livres, que são espécies químicas que contém um ou mais elétrons desemparelhados, os quais são extremamente instáveis e responsáveis pela destruição de outras células através da captura de elétrons com a finalidade de alcançar estabilidade.

Segundo o FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) os antioxidantes são substâncias utilizadas para preservar alimentos, pois retardam a deterioração, rancidez e a descoloração devido à autooxidação. O efeito antioxidante consiste em inativar os radicais livres, absorver oxigênio e quelar íons metálicos (ARAÚJO, 2008). A geração de radicais livres produz danos aos ácidos graxos insaturados devido à formação dos peróxidos e oxigênio singlete. A atividade antioxidante consiste em evitar a propagação dos radicais peróxidos, evitando continuidade da reação de oxidação (COHEN; ROBINSON; BHAGAVAN, 2000).

Os antioxidantes são comumente usados para inibir, prevenir ou retardar a deterioração causada pela oxidação, podendo atuar na redução dos radicais livres

(antioxidantes primários) ou por mecanismo que não envolve a redução direta dos radicais livres (antioxidante secundário). Os antioxidantes primários, como os compostos fenólicos, 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 (MESSIAS, 2009). O mecanismo de ação deste tipo de antioxidante está representado pela Figura 4.

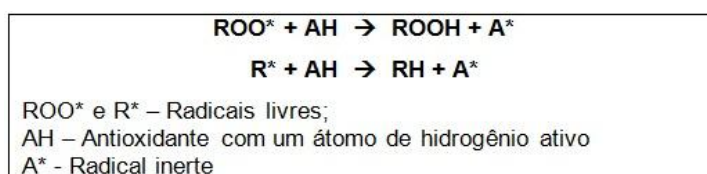


Figura 4 - Mecanismo de ação de antioxidantes primários

Fonte: Ramalho; Jorge (2006).

Os antioxidantes secundários atuam por uma variedade de mecanismos incluindo a ligação com íons metálicos, a redução de oxigênio, a conversão de hidroperóxidos a espécies não radicais, a absorção de radiação ultravioleta ou a desativação do oxigênio singlete (POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2005).

Das centenas de compostos que têm sido propostos para inibir a deterioração oxidativa das substâncias oxidáveis, somente alguns podem ser usados em produtos para consumo humano (MESSIAS, 2009). Na seleção de antioxidantes, são desejáveis propriedades tais como, eficácia em baixas concentrações, ausência de efeitos indesejáveis no odor, sabor, na cor ou em outras características do alimento, fácil aplicação; estabilidade nas condições de processamento e armazenamento, e seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes são encontrados naturalmente nos alimentos ou adicionados intencionalmente para retardar a oxidação e manter suas características sensoriais. As indústrias de alimentos em sua maioria fazem o uso de antioxidantes sintéticos, os mais utilizados são BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno), TBHQ (terc-butilhidroquinona) e PG (galato de propila), cuja ação consiste na rápida doação de um átomo de hidrogênio para o radical livre. Entretanto, durante o processamento térmico a 185 °C ocorrem volatilização e decomposição destes antioxidantes (HAMAMA e NAWAR, 1991; SOUSA et al., 2007). Estes são

compostos com estrutura fenólica (Figura 5) que ao doar um próton a um radical livre regenera a molécula de acilglicerol e interrompe o mecanismo de oxidação por radicais livres, os quais podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação (MESSIAS, 2009).

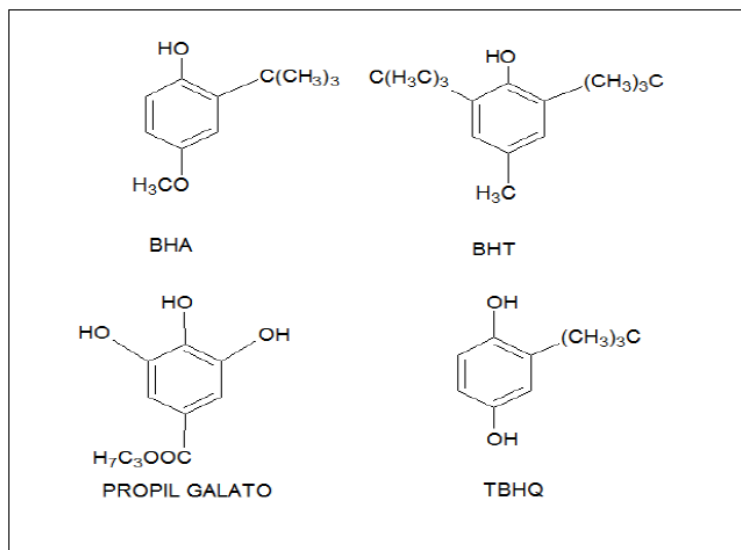


Figura 5 - Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos

Fonte: Ramalho; Jorge (2006).

O uso destes antioxidantes em alimentos é limitado. O TBHQ não é permitido no Canadá e na Comunidade Econômica Europeia. No Brasil, o uso destes antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde, que limita 0,01 g/100g para o BHA, BHT e PG, como concentrações máximas permitidas (Portaria nº 1004 de 11 de dezembro de 1998, BRASIL, 1998). Estes, em doses elevadas podem interferir na saúde do consumidor, pois, estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade de antioxidantes sintéticos serem promotores de alguns tipos de câncer entre outros efeitos fisiológicos (SOARES, 2002; SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2003).

Dessa forma, tem se dado maior atenção para o uso de antioxidantes naturais em substituição aos sintéticos, visto que estes estão muitas vezes relacionados a efeitos adversos a saúde (HUR; PARK; JOO, 2007). Os aspectos toxicológicos dos antioxidantes sintéticos têm sido discutidos com controversos sobre a segurança dos aditivos de alimentos (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2003).

Assim, a procura por antioxidantes naturais foi impulsionada na década de 80, diante da comprovação de efeitos maléficos causados por doses elevadas de

BHT, BHA e TBHQ. Como consequência, ênfase foi dada à identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante provenientes de fontes naturais, como alternativas para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e limitar o uso dos antioxidantes sintéticos (MELO; GUERRA, 2002).

3.3.1 Antioxidantes naturais

Os antioxidantes naturais, presentes em frutas e vegetais, mostram evidências que podem atuar em benefício da saúde, devido à presença de compostos fenólicos, que estão associados com a atenuação de doenças cardiovasculares e prevenção do câncer e, ajudam o corpo humano a se proteger contra os danos causados pelas espécies reativas ao oxigênio, associadas com doenças degenerativas (SHAHIDI; NACZK, 2005; HUR; PARK; JOO, 2007).

Além disso, podem ser mais efetivos no controle da oxidação lipídica em alimentos. Nos alimentos, os antioxidantes naturais tem capacidade de funcionar como inibidores de radicais livres, como quelantes ou sequestrantes do oxigênio singlete, como agentes redutores e como desativadores de metais pró-oxidantes (POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2005).

Os vegetais são fontes ricas em antioxidantes naturais como tocoferóis, vitamina C, carotenoides e compostos fenólicos. A utilização dos antioxidantes naturais tem como vantagens a aceitação imediata do consumidor e sua utilização não são limitadas pela legislação (OLIVEIRA, 2011). Assim, o uso de condimentos como antioxidantes naturais tem sido objeto de estudo em pesquisas que empregam diversas matrizes alimentares como hambúrgueres, almôndegas, embutidos, desidratados e cortes marinados (MARIUTTI et al., 2008).

O uso de conservantes naturais para aumentar a vida útil dos produtos cárneos é uma tecnologia promissora uma vez que muitas substâncias vegetais possuem propriedades antioxidante e antimicrobiana. Os ingredientes funcionais em produtos cárneos podem melhorar as qualidades nutricionais e prolongar a vida de prateleira (VIEIRA, 2012).

Vários estudos têm sido realizados visando o desenvolvimento de extratos naturais com ação antioxidante, para uso em produtos cárneos. Dentre os quais,

incluem o extrato de semente e casca de uva (SHIRAHIGUE et al., 2010) e bagaço de uva em carne de frango processada (SELANI et al., 2011), extrato de alecrim e orégano em hambúrgueres de carne bovina (TRINDADE; MANCINI-FILHO; VILLAVICENCIO, 2010), extrato de erva cidreira-de-arbusto em embutido cozido a base de carne ovina (OLIVEIRA, 2011), extrato de própolis em linguiça toscana (ALVES, 2009; VIEIRA, 2012) e extratos de algas marinhas em *minced* de tilápia (CABRAL, 2012).

Entre os extratos naturais, o pólen apícola e a manjerona (*Origanum majorana* L.) vêm se destacando pelas suas diversas propriedades biológicas (CARPES et al., 2008; RAVELLI, 2011).

3.3.1.1 Pólen apícola

Segundo a Normativa nº 03, de 19 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001), define-se pólen apícola como o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuada pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido no ingresso da colmeia. O pólen apícola é coletado por uma grade de retenção, caindo em um recipiente coletor, conjunto este denominado de coletor de pólen. No final da coleta encontram-se reunidas as bolotas de grãos de coloração variável, indicando as diversas comunidades botânicas colecionadas pelas abelhas, formando uma mistura conhecida por “mix” polínico (Figura 6), sendo esse material removido pelo apicultor para o beneficiamento, comercialização e consumo animal e humano (BARRETO et al., 2006).



Figura 6 - Pellets de pólen apícola
Fonte: Do autor, 2013.

O pólen pode apresentar diversas cores conforme conteúdos de pigmentos flavonoides ou carotenoides, e dependendo do metabolismo da espécie, estes acabam por determinar também seu odor e sabor (RAMÍREZ; MONTENEGRO, 2004).

Cada tipo de pólen apícola tem suas características específicas ligadas à sua espécie floral, e o conhecimento do valor nutricional desse produto, o qual varia segundo sua origem botânica e geográfica, sazonalidade e composição química do solo pode ser utilizado no controle de sua qualidade (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005).

Porém, o seu controle também depende da limpeza, da secagem e do processo de armazenamento aplicados pelos apicultores com o objetivo de alcançar um longo período de estocagem. O conteúdo de água determina a qualidade microbiológica do pólen apícola, bem como suas características organolépticas e sua vida de prateleira (GONZÁLEZ et al., 2005).

O pólen pode ser monofloral, quando há uma única origem botânica mantendo as propriedades organolépticas e bioquímicas da planta original. Quando a oferta de plantas poliníferas na área em volta do apiário não é suficiente, as abelhas visitam outras flores ou misturam pellets de pólen de várias flores. Esse pólen passa a ser chamado de heterofloral ou poli floral e possui propriedades bioquímicas variadas (BARRETO et al., 2006).

O pólen pode ser considerado como fonte potencial de proteínas e energia para o consumo humano, com cerca de 27 g de proteínas totais e 246,5Kcal.100g⁻¹, e de aproximadamente 6,5 g de lipídios e 27 g de glicídios.100g⁻¹ (BARRETO et al., 2006). Contém, ainda, 27 minerais (principalmente potássio, cálcio, magnésio, fósforo, ferro e sódio), 18 enzimas (dentre elas, catalase, amilase e sacarase) e 22 aminoácidos livres, além de ácidos nucleicos, materiais antibacterianos e hormônios (NAGAI et al., 2007).

A Tabela 3 apresenta os parâmetros físico-químicos e microbiológicos de controle de qualidade de pólen apícola.

Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos e microbiológicos de controle de qualidade de pólen apícola

Parâmetros físico-químicos e microbiológicos	Limite/Quantidade
Umidade	4% (desidratado) e 30% (fresco)
Cinzas	Máx. 4%
Lipídios	Mín. 1,8%
Proteínas	Mín. 8%
Açúcares totais	14,5% a 55,0%
Fibra bruta	Mín. 2%
Acidez livre	Máx. 300 mEq.Kg ⁻¹
pH	4,0 a 6,0
<i>Paenibacillus larvae</i>	Ausência em 25g de pólen

Fonte: BRASIL (2001)

Além das propriedades nutricionais, o pólen apícola tem se destacado no cenário científico devido às suas propriedades bioativas, como atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antineoplásica imunomodulatória e anticariogênica (GRAIKOU et al., 2011). Segundo Xue et al. (2012), a ingestão diária de pólen de apícola pode regular funções intestinais, de forma eficaz a reduzir a fragilidade capilar, e, possui efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular, visão e pele. Além disso, o pólen apícola tem sido utilizado no tratamento da prostatite crônica, por causa de seus presumíveis efeitos anti-inflamatório e antiandrogênico (XU; GAO; SUN, 2012).

3.3.1.2 Manjerona (*Origanum majorana* L.)

A manjerona (*Origanum majorana* L.), da família *Lamiaceae* é uma planta herbácea e perene, nativa do sul da Europa e da área do Mediterrâneo (ABDEL-MASSIH et al., 2010). Esta planta possui grande importância econômica e industrial, sendo o óleo usado como tempero e condimento, as folhas e copas floridas frescas ou secas (Figura 7) altamente aromáticas são amplamente usadas para dar mais sabor aos alimentos (SELLAMI et al., 2009).

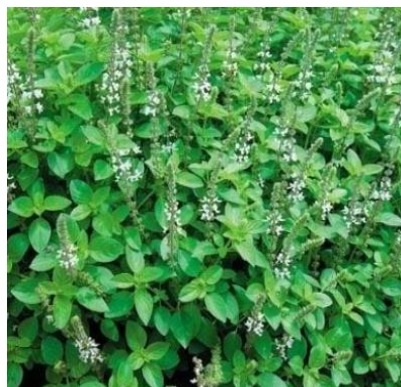


Figura 7 - Manjerona (*Origanum majorana* L.)

Fonte: Do autor, 2013.

Tradicionalmente, a manjerona tem sido usada como um remédio popular no tratamento sintomático de distúrbios gastrointestinais, tosse, contra a asma, indigestão, dor de cabeça e reumatismo (JUN et al., 2001). A manjerona é também aplicada para aliviar os sintomas do resfriado comum, como o congestionamento nasal e em bochechos para higiene bucal (HOSSAIN et al., 2011).

Os compostos aromáticos voláteis presentes na manjerona são utilizados na indústria alimentícia como aromatizantes em bebidas, condimentos, carnes, sopas em pó, sorvetes, balas, assados, entre outros (RODRIGUES, 2009). O óleo de manjerona possui propriedade antimicrobiana contra bactérias e fungos micotoxigênicos de origem alimentar e por isso, podem ter maior potencial para a utilização em aplicações industriais. *O. majorana* tem forte atividade antioxidante, principalmente por causa de seu alto teor de ácidos fenólicos e flavonoides, que são utilizados em suplementos de saúde e conservação de alimentos (VÁGI et al., 2005).

Plantas *Lamiaceae* são amplamente estudadas como fontes de antioxidante natural devido aos seus altos teores de compostos fenólicos (DORMAN et al., 2004), e especialmente porque os extratos destas plantas exibem atividade em baixas concentrações (BUSATTA et al., 2008). De acordo com Proestos; Komaitis (2008) a partir do extrato das partes aéreas secas de *O. majorana* L. em mistura com diferentes solventes orgânicos e água, são obtidas substâncias biologicamente ativas como os ácidos fenólicos (gálico, caféico, *p*-cumárico e ferúlico) e flavonoides (rutina, apigenina e eriodyctiol).

Sellami et al. (2009), ressaltam que a grande variabilidade na composição fenólica e volátil da manjerona pode ser atribuída à origem, fase de crescimento da planta, métodos de extração e a polaridade dos solventes orgânicos utilizados.

3.3.2 Métodos para avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Diversas técnicas têm sido utilizadas para se determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir rápida seleção de substâncias e/ou misturas promissora. Nota-se aumento no uso da avaliação da capacidade antioxidante em alimentos, produtos naturais, fármacos e cosméticos. Foi a partir da década de 90, quando começou a ser constatada a influencia benéfica de muitos produtos naturais na saúde humana (TIVERON, 2010). Com isso tornou-se crescente a busca e a validação de metodologias para a avaliação da atividade antioxidante em matrizes complexas, como alimentos e produtos naturais. Dentre os métodos utilizados para se estimar a capacidade antioxidante estão o ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) que mede a capacidade do antioxidante em sequestrar radicais peroxil gerados por uma fonte radicalar; a autooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, que atua como gerador de radicais livres, os quais interagirão com o β -caroteno ocasionando o decaimento da sua absorbância; teste de redução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), que é baseado na capacidade do DPPH $^{\bullet}$ reagir com doadores de hidrogênio (MELO et al., 2006); FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), que baseia-se na capacidade dos fenóis em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} (KUKKANEN et al., 2006); ABTS $^{•+}$ (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), que consiste no monitoramento do decaimento do cátion-radical ABTS produzido pela oxidação do ABTS $^{•+}$, quando uma amostra contendo antioxidante é adicionada (RE et al., 1999) e o Rancimat, que determina a estabilidade oxidativa da amostra, por meio da detecção de ácidos voláteis a 110 °C (GARCIA et al., 2006).

Essas metodologias vêm sendo muito utilizadas na determinação da atividade antioxidante de alimentos e produtos naturais devido a sua relativa simplicidade, principalmente os métodos indiretos como o DPPH $^{\bullet}$, o ABTS $^{•+}$ e o FRAP, que propicia a aplicação em rotinas laboratoriais.

Existem muitos métodos de análise antioxidante, com fundamentos, mecanismos de ação, maneiras de expressar resultados e aplicações muito diferentes, o que torna difícil a escolha de métodos mais apropriados e a comparação de dados, dessa forma, é conveniente analisar vários ensaios com

medida de diferentes aspectos químicos dos antioxidantes e compará-los com antioxidantes sintéticos (TIVERON, 2010). Preferencialmente, devem ser escolhidos métodos mais comumente aceitos, validados e padronizados, que sejam rápidos, reprodutíveis, com pequenas quantidades de reagentes, e que não sejam influenciados pelas propriedades físicas do composto (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009). Na sequência, estão abordados os 4 métodos utilizados neste trabalho, para se avaliar a atividade antioxidante dos extratos de manjerona e pólen apícola.

3.3.2.1 Método de sequestro do radical livre DPPH[•]

O ensaio do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) tornou-se bastante popular para determinar o potencial antioxidante em produtos naturais e alimentos, por se apresentar como um método simples e altamente sensível. Pode-se verificar pela estrutura do DPPH (Figura 8), que o composto pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável, que raramente pode ser oxidada irreversivelmente (BLOIS, 1958 *apud* OLDONI, 2010).

O DPPH é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta e possui absorção máxima na faixa de 515-520nm. Na presença de um doador de hidrogênio ou elétron a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

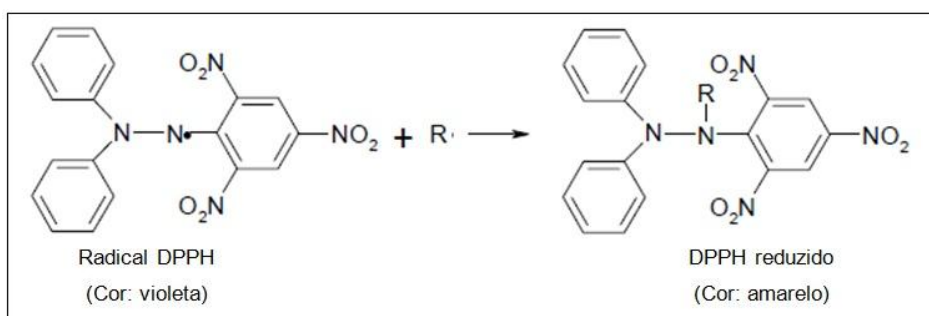


Figura 8 - Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante
Fonte: RUFINO (2008)

Apesar do ensaio do DPPH ser um teste rápido, simples, preciso e reprodutível, algumas precauções devem ser tomadas quanto à utilização do método e interpretação dos resultados, como o tipo e concentração do composto analisado, cinética de reação do antioxidante, características do meio reacional, presença de interferentes, sinergismo, afinidade solvente-substrato e forma de expressar os resultados (MOLYNEUX, 2003).

Os resultados podem ser expressos em porcentagem de atividade antioxidante, micromols de equivalentes do padrão utilizado (trolox, por exemplo) ou ainda como coeficiente de inibição (IC_{50}), que é a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de radical livre do meio em 50% (MOON; SHIBAMOTO, 2009; ATMANI et al., 2009).

3.3.2.2 Método ABTS

O método indireto do sequestro do radical ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)) também é muito utilizado. Assim como o DPPH[•], o ABTS^{•+} apresenta excelente estabilidade em determinadas condições de análise. Porém, estes radicais apresentam algumas diferenças importantes. O radical DPPH[•] já vem pronto para uso e é solúvel em solventes orgânicos, enquanto o ABTS^{•+} necessita ser gerado por reações químicas, como o perssulfato de potássio ou enzimáticas, e, é solúvel tanto em água como em solventes orgânicos, permitindo a análise de amostras hidrofílicas como lipofílicas (ARNAO, 2000).

O método, segundo Re et al. (1999), baseia-se na geração do radical ABTS, de cor azul esverdeado, formado pela reação de perssulfato de potássio com (2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)) produzindo a oxidação do ABTS. A atividade antioxidante das amostras é determinada pela descoloração do ABTS, medindo-se a redução do radical a uma absorvância de 734 nm. A Figura 9 representa a reação. A absorvância da reação da mistura de ABTS e um antioxidante são comparados com atividade do antioxidante sintético Trolox (padrão), e, os resultados são expressos em μmol de TEAC/g de amostra (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

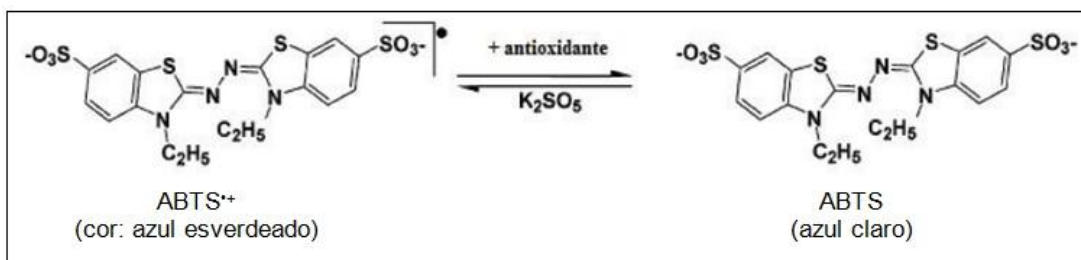


Figura 9 - Redução do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio

Fonte: RUFINO (2008)

A determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre $\text{ABTS}^{\bullet+}$ tem sido amplamente utilizada na avaliação da atividade antioxidante em alimentos e bebidas, devido a sua aplicabilidade na fase aquosa e lipídica e por oferecer resultados reprodutíveis (KUSKOSKI et al., 2005).

3.3.2.3 Método FRAP

O ensaio do FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) – Poder Antioxidante de Redução do Ferro também se fundamenta em reações de transferência de elétrons. Este método está baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} . Quando isso ocorre na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas, a redução é acompanhada pela formação de um complexo de cor azul intenso com o Fe^{2+} , com uma absorção máxima a 593nm (Figura 10) (APAK et al., 2004).

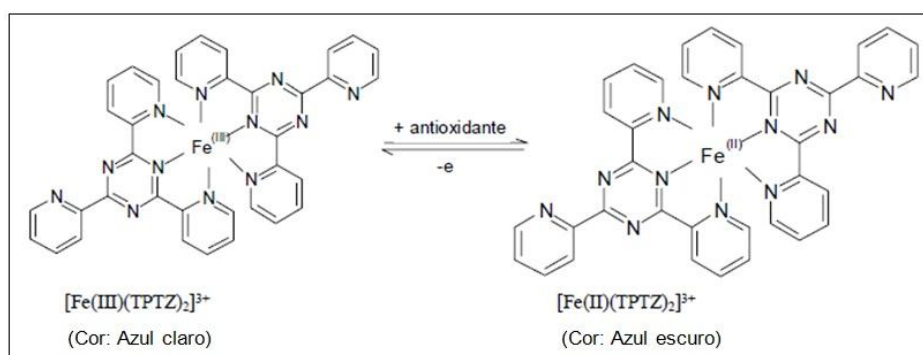


Figura 10 - Redução do complexo TPTZ com Fe^{3+}

Fonte: RUFINO (2008)

Este ensaio oferece resultados rápidos e reprodutíveis, apresentando como desvantagens o fato de que a curva padrão deverá ser realizada com um antioxidante que seja solúvel em água e geralmente não se consegue medir todos os antioxidantes presentes em uma matriz complexa (APAK et al, 2004). No entanto, muitos estudos sobre plantas e alimentos utilizam esse método em conjunto com outros testes.

3.3.2.4 Sistema β -caroteno/ácido linoleico

A análise do β -caroteno/ácido linoleico é considerada como um método direto, uma vez que é baseada no estudo de alimentos contendo antioxidantes na oxidação degradativa de um sistema em teste. O substrato da oxidação podem ser lipídios individuais, mistura de lipídios, proteínas, DNA, entre outros. A peroxidação lipídica é a mais conveniente para este fim (ROGINSKY; LISSI, 2005).

No ensaio da oxidação acoplada do β -caroteno/ácido linoleico, o sistema modelo ao ser submetido em condições de oxidação, gera um radical livre a partir da oxidação do ácido linoleico, que irá abstrair o hidrogênio da molécula instaurada do β -caroteno. Como resultado da oxidação desta molécula, o sistema perde a coloração amarelo escuro, que é monitorada espectrofotometricamente de modo a quantificar o grau de inibição da oxidação pelo antioxidante a ser testado (MOLYNEUX, 2003).

Trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação (descoloração) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico. A determinação é efetuada a 470nm, e os resultados são expressos em percentagem de inibição da oxidação. Conforme Rufino (2008), este é um método simples, sensível, mas não específico, pois, substâncias oxidantes ou redutoras interferem no ensaio. A co-oxidação do β -caroteno é normalmente efetuada no meio emulsionado, o que origina muitas vezes falta de reprodutibilidade dos valores de absorbância medidos. No entanto, apesar dos inconvenientes citados, este método é amplamente usado e como não recorre a altas temperaturas, permite a determinação do poder antioxidante de compostos termo sensíveis.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Amostra de manjerona

A amostra de manjerona (*Origanum majorana* L.) foi adquirida de produtores que abastecem a Feira do Produtor Rural no município de Pato Branco-PR (latitude: 26° 13' 46" - Sul e longitude: 52° 40' 14" – W-GR), durante o segundo semestre de 2011 e primeiro semestre de 2012. Imediatamente após a colheita, as partes aéreas da planta foram secas em estufa com aquecimento a temperatura inferior a 40 °C, para promover a inativação enzimática através da retirada de água. Após a secagem, as folhas foram trituradas em moinho de bancada Marconi modelo MA – 630 e devidamente embaladas e armazenadas em freezer à -10 °C, até o momento da extração.

4.1.2 Amostra de pólen apícola

A amostra de pólen apícola orgânico foi fornecida na forma desidratada e comercial pela Breyer S.A. Ltda. de União da Vitória-PR (latitude: 26° 13' 48" - Sul e longitude: 51° 05' 11" – W-GR). O pólen apícola oriundo de colmeias de abelhas *Apis mellífera* L. e foi coletado no período da primavera, no final de setembro de 2011. A amostra foi triturada em moinho de bancada Marconi modelo MA – 630, embalada e armazenada em freezer à -10 °C, até o momento da extração e das análises químicas.

4.1.3 Preparo do Extrato Etanólico de Pólen apícola (EEP)

Baseando-se em estudo preliminar sobre a comparação entre duas condições de extração (ANEXO A), optou-se por realizar a extração em *Shaker* por apresentar superioridade nos resultados. Considerando-se o estudo das melhores condições de extração com diferentes concentrações de etanol realizado por Carpes et al. (2007), optou-se por utilizar etanol 80%. O extrato foi preparado pesando-se dez gramas de pólen apícola desidratado e moído, extraídas com 100 mL de etanol a 80% v/v, homogeneizadas em Incubadora *Shaker* Modelo SL 222, a 150 rpm, a 40 °C por 60 min. Após a filtração em papel de filtro qualitativo, os filtrados obtidos foram armazenados a 0 °C em tubos de ensaio com rosca para posterior análises químicas.

Previamente à aplicação no produto, o solvente contido no filtrado foi eliminado em evaporador rotativo (Fisatom® 802) com vácuo e temperatura da água do banho a 45 °C (± 1 °C). A parte remanescente foi congelada e liofilizada por 48 horas em liofilizador (modelo L101), armazenada ao abrigo da luz e mantida em freezer até o momento a ser utilizada.

4.1.4 Preparo do Extrato Etanólico de Manjerona (EEM)

Dez gramas das partes aéreas secas e moídas foram extraídas com 100 mL de etanol a 80% v/v, homogeneizadas em Incubadora *Shaker* Modelo SL 222, a 150 rpm, a 40 °C por 60 min. Após a filtração em papel de filtro qualitativo, os filtrados obtidos foram armazenados a 0 °C em tubos de ensaio com rosca para posterior análises químicas.

A seguir, previamente à adição na formulação de hambúrguer, o solvente contido no filtrado foi eliminado em evaporador rotativo (Fisatom® 802) com vácuo e temperatura da água do banho a 45 °C (± 1 °C). A parte remanescente foi congelada e liofilizada por 48 horas em liofilizador (modelo L101) e armazenada ao abrigo da luz, mantida em freezer até o momento a ser utilizada.

4.2 MÉTODOS

O estudo foi dividido em duas partes, uma a caracterização química e atividade antioxidante dos extratos e a segunda parte a formulação dos hambúrgueres com a avaliação da oxidação lipídica, análise físico-química e microbiológica e análise sensorial. Na Figura 11, está esquematizado o fluxograma do estudo desde a aquisição das amostras até as análises realizadas.

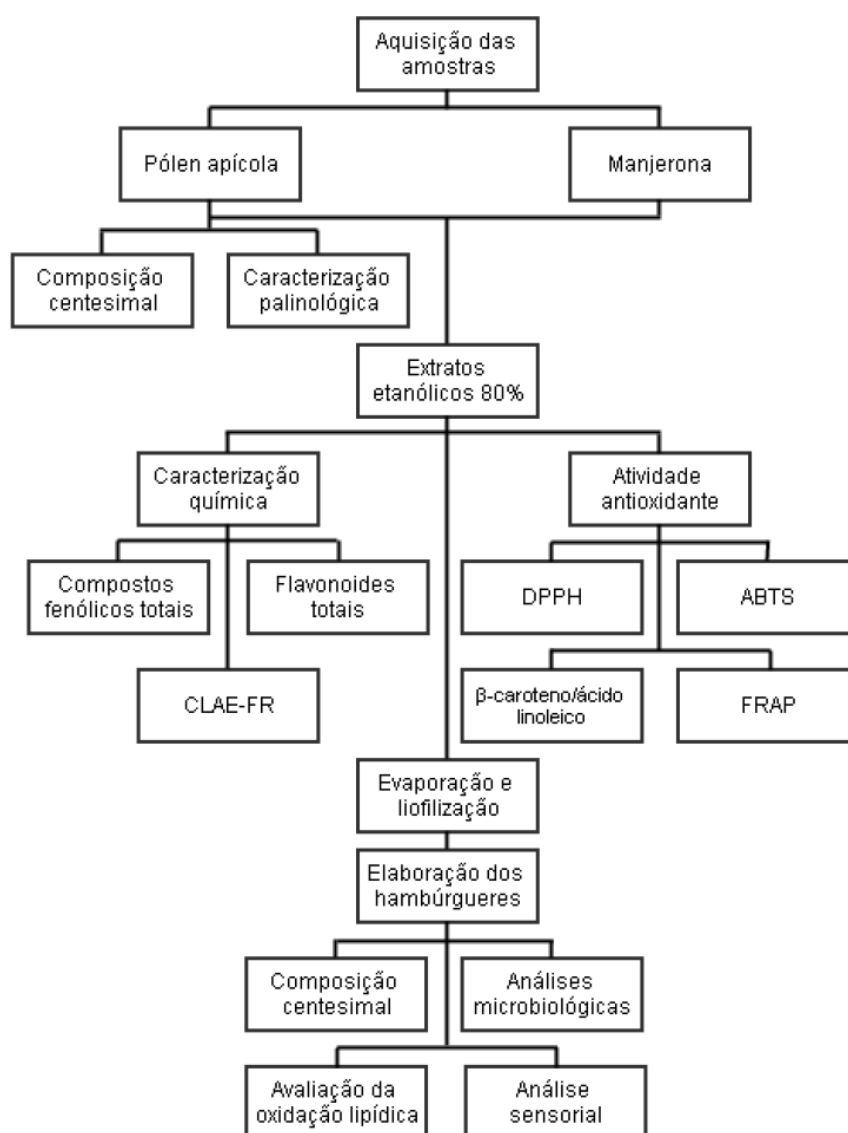


Figura 11 - Fluxograma do estudo desde a aquisição das amostras até as análises

Fonte: Do autor, 2013.

4.2.1 Composição química do pólen apícola

A medida da atividade de água do pólen apícola foi realizada no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Tecnologia em Alimentos da UTFPR – Câmpus Francisco Beltrão-PR. E as demais análises de composição química do pólen apícola foram realizadas no Laboratório de Qualidade Agroindustrial – LAQUA da UTFPR – Câmpus Pato Branco-PR.

A amostra de manjerona não foi analisada quanto à composição centesimal, por não apresentar regulamento técnico de identidade e qualidade específico, portanto, não se tem parâmetros estabelecidos na legislação, nem trabalhos disponíveis na literatura, o que torna difícil de avaliar e comparar.

4.2.1.1 Atividade de água (A_w)

A atividade de água do pólen apícola foi verificada utilizando aparelho medidor de atividade de água Aqualab Lite (Decagon), por medida direta nas amostras previamente trituradas e à temperatura de 20 °C.

4.2.1.2 Umidade

Aproximadamente 2g de pólen apícola previamente moído foram secos por secagem direta em estufa a 105 °C até peso constante, conforme procedimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008).

4.2.1.3 Teor de cinzas

Dois gramas de pólen moído foram colocados em cadinhos de porcelana e incinerados em mufla a 550 °C, até obtenção de cinzas brancas (aproximadamente 4h). Após o resfriamento em dessecador, as cinzas foram determinadas por gravimetria (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.2.1.4 Minerais

A partir da determinação do teor de cinza, os minerais foram determinados. As cinzas foram solubilizadas com 25 mL de HNO₃ 50%, aquecidas em banho-maria por 30 min e filtradas em balão volumétrico de 100 mL, lavando o cadinho com água deionizada quente. Após a aferição com H₂O deionizada quente, os minerais foram analisados em espectrofotômetro de absorção atômica, em comprimento de onda específico para cada mineral (Fe, Ca, Zn, K, Na, Cu, Mg e Mn) (AOAC, 2000).

4.2.1.5 Proteína total

O teor de proteína foi determinado conforme metodologia da AOAC (2000). Aproximadamente 0,7g de pólen moído foram digeridos em balão macro Kjeldahl com 4g da mistura catalítica (1:3 de CuSO₄ e K₂SO₄) e 20 mL de H₂SO₄ concentrado. A solução digerida, foi adicionado 80 mL de NaOH 40% para a liberação da amônia, a qual foi recolhida dentro de uma solução de H₂SO₄ e, então, titulada com uma solução padronizada de NaOH 0,1 mol/L. Para determinação do teor proteína total, os valores de nitrogênio foram multiplicados pelo fator de conversão de 6,25 (IAL, 2008).

4.2.1.6 Lipídeos

Os lipídeos totais foram determinados por gravimetria segundo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008). Dois gramas de pólen moído foram extraídos com éter de petróleo à quente em aparelho Soxhlet, por aproximadamente 4 horas.

4.2.1.7 Fibras

Dois gramas de pólen moído e desengordurado em éter de petróleo, foram digeridos a quente com solução ácida e posteriormente com NaOH 0,313 M, por um período de 30 minutos em cada digestão. Após a neutralização do resíduo com água quente foi feita a lavagem com 20 mL de álcool etílico e 10 mL de éter etílico. O resíduo foi, então, incinerado a 550 °C em mufla e as fibras quantificadas por gravimetria (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.2.1.8 Carboidratos

Para a determinação do teor de açúcar redutor em glicose, dois gramas de pólen moído foram dissolvidos em 50 mL de água destilada e transferidos para balão volumétrico de 100 mL, foi feita a filtração recebendo o filtrado em erlenmeyer. Em erlenmeyer foram adicionados 10 mL da solução de Fehling A e B e 40 mL de água destilada aquecendo até a ebulição, a solução da amostra foi transferida para bureta e titulada, adicionando-se duas gotas de azul de metila 0,5% até o desaparecimento da coloração azul (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Para a determinação de açúcares não redutores em sacarose, dois gramas de amostra dissolvidos em água destilada foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL, em seguida adicionaram-se 2 mL de HCl e levado para banho-maria a 60 °C/60 minutos, após resfriado, foi neutralizado com NaOH 40%, com auxílio de

papel indicador, completou-se o volume com água e fez-se a filtração recebendo o filtrado em frasco erlenmeyer, este foi transferido para bureta. Em erlenmeyer adicionou-se 10 mL de solução de Fehling A e B e 40 mL de água, aqueceu-se até a ebulição. Adicionou-se as gotas da solução da bureta sobre a solução do erlenmeyer em ebulição, agitando, até que a solução passasse de azul a incolor (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.2.2 Caracterização palinológica do pólen apícola

4.2.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Essa análise foi realizada nas dependências da Central de análises, no Laboratório de Microscopia e Infravermelho da UTFPR – Câmpus Pato Branco-PR.

A avaliação botânica dos pellets de pólen apícola foi realizada segundo Barth (1989) e Louveaux (1990). Aproximadamente 2 g de amostra correspondendo aproximadamente a 350 grãos de pólen, foram consideradas representativas para a análise do pólen. As cargas de pólen foram agrupadas em sub amostras de acordo com a sua coloração e cada sub amostra foi pesada e então analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em Tabletop Microscope TM3000: Hitachi.

Os termos usados para expressar a frequência ou a porcentagem de cada tipo de pólen foi estabelecido como: “Pólen predominante ou dominante” (> 45% do total) (PD); “Pólen acessório ou secundário” (16-45%) (PA); “Pólen isolado importante” (3-15%) (PII) e “Pólen isolado ocasional” (<3%) (PIO) (BARTH, 1989).

4.2.3 Caracterização química do EEM e do EEP

4.2.3.1 Determinação de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton; Orthofer; Lamuela (1999), utilizando-se ácido gálico como padrão de referência. O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução de íons poliméricos complexos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente de coloração amarela oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul que se forma na reação em meio alcalino. Para o Extrato Etanólico de Manjerona (EEM) utilizou-se diluição em etanol 80% 1:100 (v/v), enquanto o Extrato Etanólico de Pólen apícola (EEP) foi diluído em 1:50 v/v. Uma alíquota de 0,5 mL dos respectivos extratos foi transferida para tubos de ensaio e adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água destilada 1:10 (v/v). Após 5 minutos de repouso da mistura, foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio a 4% (v/v). As soluções foram incubadas em local escuro, à temperatura ambiente e após duas horas de repouso foram realizadas leituras em espectrofotômetro SHIMADZU Modelo UV 1800 a 740 nm. O branco foi conduzido nas mesmas condições. Construiu-se uma curva analítica contendo 5, 10, 25, 50, 75 e 100 ppm de ácido gálico e os resultados foram expressos em mg EAG/g de amostra (EAG: equivalentes de ácido gálico). Essas análises foram realizadas em triplicata.

4.2.3.2 Análise de flavonoides totais

A concentração de flavonoides totais foi determinada conforme método descrito por Park et al. (1995), com algumas modificações. O princípio desta reação se baseia na formação de quelatos entre o metal alumínio e os flavonoides, principalmente os flavonóis (3-hidroxi-flavonas) como a quercetina, em soluções alcoólicas, levando a um efeito batocrômico do espectro de absorção de flavonoides,

com alteração da coloração (JURD; GEISSMAN, 1956 *apud* BARROS, 2011). Alíquota de 0,5mL dos extratos diluídos em etanol 80% 1:10 (v/v) foi transferida para tubos de ensaio e adicionado 4,3mL de etanol a 80% (v/v), 0,1mL de cloreto de alumínio a 10% (m/v) e 0,1mL de acetato de potássio 10% (m/v). Após 40 minutos de repouso no escuro e à temperatura ambiente, as leituras foram feitas em espectrofotômetro SHIMADZU Modelo UV 1800, a 415nm. Tubos em branco foram conduzidos nas mesmas condições, sem adição de cloreto de alumínio. Construiu-se uma curva analítica contendo 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg de quercetina e os resultados foram expressos em mg quercetina/g de amostra. Essas análises foram realizadas em triplicata.

4.2.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR)

A análise de cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada no Laboratório de Análise Instrumental da UTFPR – Câmpus Campo Mourão-PR. Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em um sistema Dionex Ultimate 3000 (Dionex, Idstein, Alemanha) cromatógrafo equipado com RP-18 Acclaim® 120 coluna (4,6 mm x 250mm x 5 µm) e um conjunto de detector de diodos (HPLC/PDA). O EEM e EEP foram filtrados através de um filtro de 0,22 µm (Millipore) e injetados com 10 µL do filtrado. A fase móvel consistiu de um gradiente linear de ácido fosfórico: água (1:100) (solvente A) e metanol (solvente B), começando com 5% de B e aumentando para 100% de B (45 minutos), mantendo a 100% de B durante 5 minutos e diminuindo a 5% de B (60 – 70 min) com uma taxa de fluxo de solvente de 1 mL/min. Os compostos fenólicos foram identificados com base nos tempos de retenção e padrão de absorção de UV-Vis, e o pico de pureza confirmado pelo detector por arranjo de diodos (DAD) e software Chromeleon. A quantificação foi realizada por calibração externa (HAMINIUK et al., 2011; 2012). Foram examinados os seguintes padrões autênticos de ácidos fenólicos e flavonoides: ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido gálico, quercetina, canferol, ácido trans-cinâmico, ácido cafêico, pinocembrina, crisina, rutina, galangina e miricetina.

4.2.4 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do EEP e EEM

4.2.4.1 Atividade de sequestro do radical DPPH^{*}

A atividade sequestrante do radical DPPH^{*} (1,1-difenil-2-picrilidrazina) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995) com modificações por Mensor et al. (2001), em triplicata. A medida da capacidade sequestrante por este método se baseia no princípio de que o DPPH, sendo um radical estável de coloração violeta, aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula estável, sendo reduzido na presença de um antioxidante e adquirindo uma coloração amarela. Na forma de radical, o DPPH^{*} possui uma absorção característica a 517 nm, que desaparece à medida que ele vai sendo reduzido pelo hidrogênio doado por um antioxidante (MENSOR et al., 2001). Para avaliação da atividade antioxidante, o EEP e o EEM foram reagidos com o radical estável DPPH^{*} em uma solução de etanol.

A mistura de reação foi constituída da adição de 0,5 mL das diluições dos extratos etanólicos das amostras, 3 mL de etanol 80% e 0,3 mL da solução do radical DPPH em solução de etanol 0,5mM. Para cada amostra foi realizado teste em branco, substituindo-se o volume da solução de DPPH por igual volume de solvente. O controle negativo consistiu na substituição do volume do extrato por igual volume do solvente utilizado na extração (etanol 80%).

Fez-se uma curva cinética de cada amostra e das substâncias de referência ou controles positivos (BHT, BHA e α -tocoferol), para determinar o tempo necessário para chegar à estabilização das absorbâncias. A redução do radical DPPH^{*} foi medida por meio de um monitoramento contínuo do declínio da absorbância a 517nm, a cada 20 minutos até valores estáveis de absorção.

Os resultados foram expressos de duas formas distintas: IC₅₀ e porcentagem de inibição. Uma das formas de se expressar a atividade antioxidante pelo método do DPPH é através do coeficiente de inibição (IC₅₀), ou seja, a concentração mínima necessária para os extratos reduzirem em 50% o DPPH inicial da reação. Quanto

menor o IC₅₀, melhor é a atividade antioxidante (KULISIC, DRAGOVIC-UZELAC; MILOS, 2006).

Os valores de IC₅₀ foram calculados por regressão linear de gráficos onde o eixo das abscissas (X) representa a concentração em µg/mL e o eixo das ordenadas (Y) a % média da atividade antioxidante das triplicatas, segundo a fórmula de Mensor et al. (2001) (Equação 1).

$$\%AA=100 - \{[(Abs_a - Abs_b) \times 100]/Abs_c\} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: Abs_a = Absorbância da amostra; Abs_b = Absorbância do branco, e Abs_c = Absorbância do controle negativo.

4.2.4.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+}

Para a determinação da atividade antioxidante utilizou-se o método ABTS^{•+} (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolona-6-ácido sulfônico)) conforme metodologia descrita por Re et al. (1999) e Rufino et al. (2007). O radical ABTS^{•+} foi formado pela reação da solução ABTS 7mM com persulfato de potássio 140 mM, incubados à temperatura de 25 °C ao abrigo da luz, durante 12-16 h. Uma vez formado, o radical foi diluído em etanol absoluto até a obtenção do valor de absorbância de 0,700 a 734nm. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 30 µL dos EEM e EEP diluídos 1:20 (v/v) e 1:10 (v/v) em etanol 80% (v/v), respectivamente. Os antioxidantes comerciais (BHT, BHA e α-tocoferol) em concentrações de 100 ppm foram transferidos para tubos de ensaio com 3 mL da solução do radical ABTS^{•+}. A leitura foi feita após 6 minutos da reação a 734 nm, utilizando etanol P.A. como branco. Foi utilizado como referência o Trolox, um antioxidante sintético análogo à vitamina E, nas concentrações de 50-1500 µM. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em µmol TEAC/g de amostra (TEAC - atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

4.2.4.3 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro - FRAP

Para a determinação da atividade antioxidante, por meio da redução do ferro - FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), utilizou-se a metodologia descrita por Rufino et al. (2006) e Kukic et al. (2008), com algumas modificações. Este método se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra reduzirem, em meio ácido (pH 3,6), o complexo Fe^{3+} /tripiridiltriazina (TPTZ), para formar Fe^{2+} , de intensa cor azul e absorção máxima a 593 nm. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5 mL de FeCl_3 (20 mM) em solução aquosa. Uma alíquota de 100 μL das diluições dos extratos de manjerona 1:200 (v/v) e de pólen 1:100 (v/v), e os antioxidantes comerciais BHT, BHA e α -tocoferol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), foram adicionados a 3 mL do reagente FRAP e incubado a 37 °C em banho-maria por 30 min. As absorbâncias foram medidas após esse tempo e o espectrofotômetro foi zerado com a solução FRAP. A curva de calibração foi feita com sulfato ferroso (100-2000 μM), e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ de amostra.

4.2.4.4 Autoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

A medida da atividade antioxidante pela oxidação acoplada do β -caroteno e do ácido linoleico foi realizada de acordo com o método de Emmons, Peterson e Paul (1999) e Ahn et al. (2004). Foram pesados 10 mg de β -caroteno, os quais foram dissolvidos em 100 mL de clorofórmio. Alíquotas de 3 mL da solução clorofórmio/ β -caroteno foram adicionadas a 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de Tween 40. Em seguida, o clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio e o resíduo obtido redissolvido em 100 mL de água aerada por 30 min. Alíquotas de 3 mL da emulsão β -caroteno/ácido linoleico foram misturadas com 300 μL do EEM diluídos 1:20 (v/v) e EEP diluídos 1:10 (v/v) em etanol a 80% (v/v). A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 470 nm, no tempo inicial e em intervalos de 20 minutos com incubação em banho-maria a 50 °C, até o tempo

de estabilização final. A amostra controle consistiu de 300 µL de etanol a 80%. Foram utilizados padrões de referência (BHT, BHA e α-tocoferol) em concentrações de 100 ppm. A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição relativa em relação ao controle depois de 100 min de incubação, usando a Equação 2:

$$AA(\%) = (DR_C - DR_S) / DR_C \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde: DR_C = taxa de degradação do controle ($= \ln(a/b)/100$); DR_S = taxa de degradação da amostra contendo a substância teste ($= \ln(a/b)/100$); “a” e “b” são as absorbâncias no tempo inicial (0 min) e no tempo final (100 min), respectivamente.

4.2.5 Elaboração do produto

A elaboração dos hambúrgueres foi conduzida segundo formulação e procedimentos recomendados por Terra (1998), no Laboratório de Industrialização de Carnes da UTFPR – Câmpus Medianeira-PR. Na formulação do hambúrguer utilizou-se carne de traseiro bovino magro (73%), proteína texturizada de soja, hidratada 1:3 com água gelada (20%), toucinho (7%), sal (1,5%), glutamato monossódico (0,2%), pimenta branca moída (0,1%), alho em pó (0,1%) e cebola em pó (0,1%) que foram cedidos pela empresa Frimesa Unidade Frigorífica de Medianeira-PR.

Para o preparo dos hambúrgueres, moeu-se a carne bovina em disco de 10 mm, picou-se o toucinho e hidratou-se a proteína texturizada de soja com água mineral gelada. Homogeneizou-se a carne bovina com os demais ingredientes em cutter e posteriormente, dividiu-se a massa cárnea em quatro porções iguais de 5 kg. Utilizou-se cada porção na elaboração de uma formulação: tratamento 1 (T1, sem adição de BHT e de extrato natural), tratamento 2 (T2, adicionada de 0,01% do antioxidante sintético BHT), tratamento 3 (T3, adicionada de 0,3% de extrato de manjerona) e tratamento 4 (T4, adicionada de 0,3% de extrato de pólen apícola).

Após a completa homogeneização de cada tratamento, os hambúrgueres foram moldados em fôrma própria, obtendo produtos com peso médio de 80 g. Em

seguida foram embalados em filme de polietileno sob vácuo, identificados e levados ao congelamento em temperatura de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A quantidade de BHT adicionado ao produto foi conforme o limite ($0,01\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$) estabelecido na legislação brasileira IN nº 51 de 29 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006). A seleção dos extratos de manjerona e de pólen apícola, assim como as concentrações a serem testadas (0,3%) foi baseada em resultados obtidos em experimentos realizados previamente.

O fluxograma básico de operações para elaboração do hambúrguer está apresentado na Figura 12.

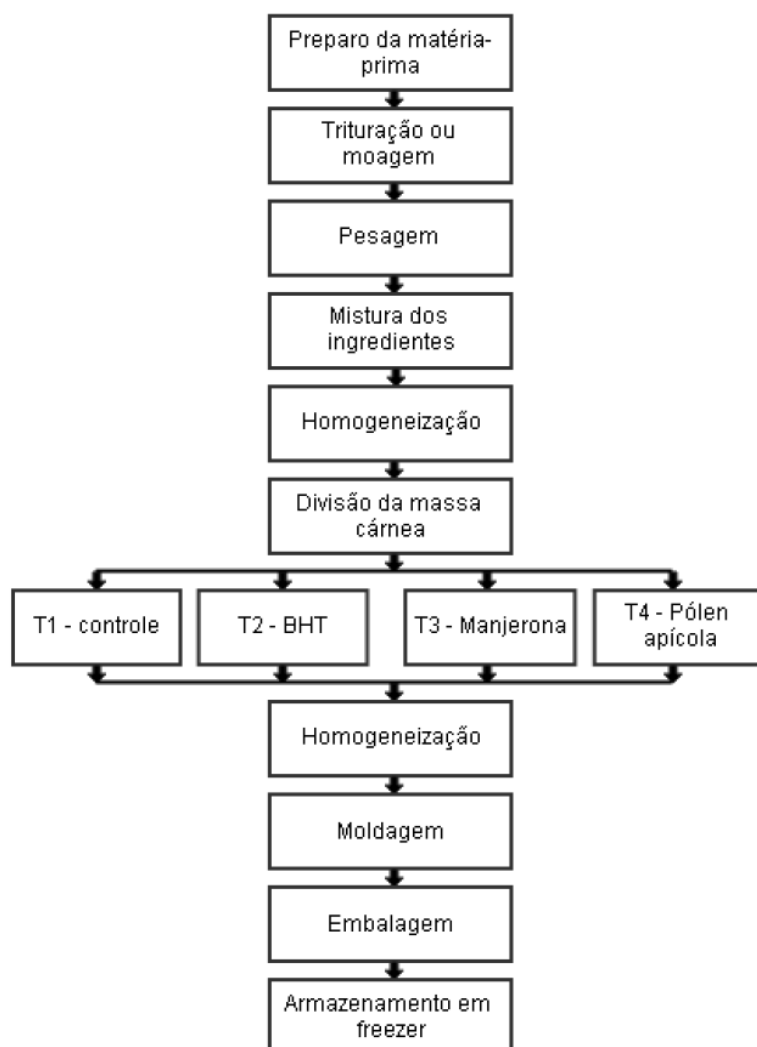


Figura 12 - Fluxograma básico do processamento dos hambúrgueres
Fonte: Do autor, 2013.

4.2.6 Composição centesimal dos hambúrgueres

As análises de composição centesimal e microbiológica dos hambúrgueres foram realizadas no Laboratório de análises microbiológicas e físico-químicas de alimentos e água – LAMAG, da UTFPR – Câmpus Medianeira-PR. Essas análises foram realizadas logo após o processamento em todos os tratamentos, nas amostras cruas. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada determinação.

4.2.6.1 Teor de umidade

Aproximadamente 5 g de hambúrguer previamente triturados foram secos por secagem direta em estufa a 105 °C até peso constante, conforme procedimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008).

4.2.6.2 Teor de cinzas

Cinco gramas de hambúrguer devidamente triturados foram colocados em cadinhos de porcelana e incinerados em mufla a 550 °C, até obtenção de cinzas brancas (aproximadamente 4h). Após o resfriamento em dessecador, as cinzas foram determinadas por gravimetria (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.2.6.3 Proteína total

A proteína bruta foi quantificada mediante a determinação do nitrogênio total, pelo método de Kjeldahl conforme metodologia da AOAC (2000). Utilizando o fator 6,25 para conversão do valor de nitrogênio em proteína (IAL, 2008).

4.2.6.4 Lipídeos

O teor de lipídeos foi determinado por extração direta em Soxhlet, segundo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008). Dois gramas de amostra triturada foram extraídos com éter de petróleo à quente em aparelho Soxhlet.

4.2.6.5 Carboidratos totais

Os carboidratos totais foram estimados por diferença, diminuindo-se de 100 a somatória dos demais componentes.

4.2.7 Avaliação da oxidação lipídica

4.2.7.1 Índice de peróxido (IP)

A determinação do índice de peróxidos (IP) foi realizada de acordo com a Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho de 1999 (BRASIL, 1999). Foram pesados 30 g da amostra, triturou-se em processador com 250 mL de clorofórmio por 3 min, filtrou-se em papel de filtro, e após foi refiltrado em papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro, utilizando 100 mL de clorofórmio para lavar o recipiente. Transferiram-se 25 mL de filtrado em erlenmeyer e adicionado 37 mL de ácido acético P.A. e 1 mL de solução saturada de iodeto de potássio, agitou-se ocasionalmente por 1 min em ausência de luz. Em seguida, adicionaram-se 30 mL de água destilada e titulou-se com solução de tiosulfato de sódio 0,01 mol/L usando solução de amido a 1% como indicador (BRASIL, 1999). Foi preparada uma prova em branco subtraindo seu resultado da titulação da amostra. Esta análise foi

realizada ao zero dia, e aos 14, 28 e 42 dias de armazenamento. Calculou-se o índice de peróxido, em miliequivalentes, por kg de amostra (mEq/kg), pela Equação 3:

$$(A - B) \times N \times 1000/P \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde: A = mL de solução de tiosulfato de sódio 0,01mol/L gasto na titulação da amostra; B = mL de solução de tiosulfato de sódio 0,01mol/L gasto na titulação do branco; N = normalidade real da solução de tiosulfato de sódio e P = peso da amostra, em gramas.

4.2.7.2 Índice de TBARS

O teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicador de peroxidação lipídica, foi avaliado pelo método de extração em ácido tricloroacético (TCA), conforme Vyncke (1970), utilizando o tetrametoxipropano para a obtenção da equação de reta utilizada no cálculo dos valores de TBARS ($y = 76,924x + 0,0018$).

Para a extração dos aldeídos foi preparado um extrato ácido aquoso homogeneizado em dispersor Extratur (Quimis), com 5 g de amostra e 25 mL de ácido tricloroacético (TCA) diluído em PG e um agente quelante, o EDTA sódico, com a finalidade de evitar a formação errônea de malonaldeído ou outras substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) durante mistura e filtração da amostra. Esse extrato filtrado reagiu com a solução de TBA sob aquecimento (95 °C) por 40 min, em banho-maria, para a formação do complexo colorido, o qual foi medido em espectrofotômetro SHIMADZU Modelo UV 1800, no comprimento de onda de 538 nm. Os resultados foram expressos em “valor de TBARS”, definido como mg de malonaldeído por Kg de amostra. Esta análise foi conduzida nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de armazenamento, conforme Brum et al. (2011) e Viera (2012) com algumas modificações.

4.2.8 Análises microbiológicas dos hambúrgueres

As análises microbiológicas foram realizadas no tempo zero, ou seja, logo após elaboração dos produtos. Foram realizadas as análises microbiológicas previstas pela legislação para produtos cárneos crus, refrigerados ou congelados (hambúrgueres, almôndegas, quibe e similares), através da RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), que preconiza: Coliformes a 45 °C, Estafilococos coagulase positiva, *Clostridium* sulfito redutor a 45 °C e *Salmonella* sp.

4.2.8.1 Coliformes totais e termotolerantes

O método utilizado para determinar os coliformes totais a 35 °C e termotolerantes a 45 °C foi o método de contagem de colônia, conforme a IN nº 62 de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003), utilizando-se ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA), com temperatura de incubação de 36 ± 1 °C pelo período de 24 a 48h e posterior contagem das colônias suspeitas. A prova confirmativa para coliformes totais foi feita por meio da inoculação das colônias suspeitas em caldo verde brilhante bile 2% lactose e posterior incubação a 36 ± 1 °C. As culturas suspeitas de coliformes termotolerantes (a 45 °C) foram inoculadas em caldo EC (*Escherichia coli*), e incubadas em temperatura seletiva de 45 °C, por 24 a 48h em banho-maria com agitação. O resultado foi expresso em UFC/g (BRASIL, 2003).

4.2.8.2 Estafilococos coagulase positiva

Foram determinados Estafilococos coagulase positiva de acordo com IN nº 62 de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003), utilizando-se Agar Baird-Parker. As diluições foram semeadas em placas e incubadas invertidas a 36 °C por 30 a 48h. Foram realizadas as contagens de colônias típicas, de cor preta brilhante com anel branco opaco rodeado com halo claro transparente. Para confirmação do teste de

coagulação do *Staphylococcus* coagulase positiva, as colônias típicas foram selecionadas e semeadas em caldo de infusão cérebro-coração (BHI), confirmadas em plasma de coelho. O resultado foi expresso em UFC/g (BRASIL, 2003; SILVA et al., 2010).

4.2.8.3 Contagem de *Clostridium* sulfito redutor

A partir de 25 g de amostra foi realizada a inoculação da amostra em meios de cultura seletivos ágar TSC (ágar triptose sulfito cicloserina) com sobre camada. Após, as placas foram incubadas em jarras de anaerobiose a 36 °C/18 a 24 horas (IN nº 62 de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003)).

4.2.8.4 Pesquisa de *Salmonella* sp.

Realizou-se a pesquisa de *Salmonella* sp. de acordo com IN nº 62 de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003). Para o pré-enriquecimento foram pesados 25 g de amostra e homogeneizados em 225 mL de água peptonada tamponada 1% incubados a 36 °C durante 16 a 20 horas. Após, realizou-se um enriquecimento seletivo em caldo tetrionato e caldo rappaports vassiliadis, em banho-maria a 41 ± 0,5 °C por 24 a 30 horas. A partir destes, foi semeada uma alíquota em duas placas com ágar BPLS (ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose) e em duas placas de ágar XLD (Xilose lisina desoxicolato) e em duas placas de ágar BS (Bismuto sulfito), incubadas a 36 ± 1 °C por 18 a 24h foram selecionadas de três a dez colônias suspeitas conforme as características de cada meio para confirmação da série bioquímica e para a confirmação do teste de sorologia. Expressaram-se os resultados como ausência ou presença em 25 g (BRASIL, 2003; SILVA et al., 2010).

4.2.9 Análise sensorial

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), em seus aspectos éticos e metodológicos, sendo conduzido de acordo com as diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Sob parecer nº 46316, divulgado pelo CEP (ANEXO B). A avaliação sensorial foi realizada após a obtenção dos resultados das análises microbiológicas, aos 28 dias de armazenamento congelado dos hambúrgueres.

Para avaliação sensorial dos produtos foram utilizados testes de aceitação (escala do ideal e hedônica), teste de preferência (teste de ordenação) e intenção de compra. Realizaram-se os testes de aceitabilidade por meio de escalas, do ideal e hedônica. Com a escala do ideal foram obtidas informações sobre qual seria a intensidade de determinado atributo sensorial considerado ideal pelo provador (MINIM, 2006). Neste caso, os atributos cor, odor, aparência e textura, foram avaliados pelo julgador o quão próximos estavam do ideal. Na escala hedônica, o provador expressa sua aceitação fazendo uma avaliação global do produto, seguindo escala estruturada de nove pontos, variando de 9 = “gostei muitíssimo” até 1 = “desgostei muitíssimo”.

Utilizou-se o teste de ordenação visando identificar a ordem de preferência. Neste teste o julgador deve ordenar as amostras de acordo com sua preferência, sendo a amostra mais preferida classificada com o número 1, a segunda mais preferida com o número 2 e assim por diante. No teste de intenção de compra, os julgadores indicaram qual amostra comprariam se estivesse disponível para a venda no mercado.

Em testes afetivos recomenda-se que o número de julgadores seja entre 50 e 100 (IAL, 2008), portanto, a avaliação sensorial foi realizada com 112 provadores não treinados, com faixa etária média de 22 anos. Antes da avaliação, todos os provadores leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO C).

A avaliação foi realizada em cabines individuais, iluminadas com luz branca, no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia em Alimentos da UTFPR - Câmpus Medianeira.

Os hambúrgueres foram grelhados em chapa antiaderente elétrica aquecida sem adição de óleo, a 180 °C, virando-se a cada 2 min, até apresentar aspecto de grelhado. Depois de grelhados os hambúrgueres foram cortados em quatro partes iguais de aproximadamente 17 g e mantidos em estufa (60 °C) para manutenção da temperatura até o momento de servir aos julgadores. Em seguida um pedaço de cada tratamento foi servido em pratos descartáveis brancos, devidamente identificadas com números aleatórios de três algarismos. Para limpeza do paladar durante a degustação das amostras, os provadores receberam um biscoito cream cracker, um copo de água mineral (Figura 13) e a ficha para avaliação sensorial (Figura 14).



Figura 13 - Apresentação das amostras para análise sensorial

Fonte: Do autor, 2013.

Os dados referentes à aceitação foram primeiramente submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e ao teste T ao nível de 5% de probabilidade, tendo-se como fontes de variação amostras e provadores, sendo o experimento em blocos casualizados.

Para obtenção do mapa de preferência interno, os dados de aceitação da avaliação global foram organizados numa matriz de amostras e consumidores, e esta submetida à Análise de Componentes Principais (ACP).

Os resultados da avaliação global também foram expressos pelo Índice de Aceitabilidade (IA) conforme Dutcosky (2007). Para o cálculo de IA dos produtos, foi adotada a expressão: $IA (\%) = A \times 100/B$, na qual, A= nota média obtida para o

produto, e B= nota máxima dada ao produto. O IA com boa repercussão têm sido considerado $\geq 70\%$ (DUTCOSKY, 2007).

Os resultados dos testes de aceitação por escala do ideal e hedônica, para cada atributo, foram calculados também pelo Coeficiente de Concordância (CC) proposto por Silva; Duarte e Cavalcanti-Mata (2010). O cálculo do coeficiente de concordância foi realizado utilizando-se do programa computacional CONSENSOR, utilizando a expressão: $CC = \frac{CC}{100 - (d - 1)}$, em que, CC= coeficiente de concordância corrigido entre julgadores (%); fat = frequência absoluta transformada, e d = menor diferença entre os valores das duas notas de maiores frequências absolutas (SILVA; DUARTE; CAVALCANTI-MATA, 2010).

AVALIAÇÃO SENSORIAL				
Nome: _____		Data: ____/____/____		
Idade: _____		Gênero: _____		
<p>Você está recebendo amostras codificadas de Hambúrguer bovino com antioxidantes naturais. Por favor, avalie o produto de acordo com sua preferência tendo como base as escalas do ideal e hedônica, disponibilizadas a seguir:</p>				
ESCALA DO IDEAL				
1 – Muito menos que o ideal				
2 – Menos que o ideal				
3 – Ideal				
4 – Mais que o ideal				
5 – Muito mais que o ideal				
Amostras	Cor	Odor	Aparência	Sabor
352				
591				
846				
387				
<p>Com base na escala hedônica realize a avaliação global do produto levando em conta o conjunto do produto com todos os atributos anteriormente avaliados.</p>				
ESCALA HEDÔNICA				
1 – Desgostei muitíssimo				
2 – Desgostei muito				
3 – Desgostei regularmente				
4 – Desgostei ligeiramente				
5 – Indiferente				
6 - Gostei ligeiramente				
7 - Gostei regularmente				
8 - Gostei muito				
9 - Gostei muitíssimo				
Amostras	Nota da escala Hedônica - Avaliação Global do produto			
352				
591				
846				
387				
<p>Você gosta de hambúrguer? () Sim () Não</p> <p>Ordene as amostras de acordo com sua preferência. Atribua o nº 1 para a amostra de maior preferência, 2 para a segunda mais preferida e assim sucessivamente: () 352 () 591 () 846 () 387</p> <p>Você teve a percepção de ranço em alguma das amostras? () Sim () Não</p> <p>Se respondeu Sim, em qual(is) amostra(s) percebeu ranço: () 352 () 591 () 846 () 387</p> <p>Você compraria os produtos analisados? () Sim () Não</p> <p>Se respondeu Sim, qual(is) produto(s) compraria: () 352 () 591 () 846 () 387</p>				
Comentários: _____				
Obrigada Pela Colaboração!!				

Figura 14 - Ficha utilizada para avaliação sensorial

4.2.10 Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata, os dados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e teste T, considerando o nível de significância de 95% ($p < 0,05$), utilizando o pacote estatístico ASSISTAT® 7.6 Beta (2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO PÓLEN APÍCOLA

Os resultados da composição centesimal estão apresentados na Tabela 4. Os valores obtidos foram comparados com as exigências da legislação brasileira (BRASIL, 2001), com o intuito de verificar se o pólen produzido enquadra-se nas normas vigentes. Com exceção do teor de umidade, os demais parâmetros encontram-se em conformidade com as especificações da legislação brasileira.

Tabela 4 - Composição centesimal da amostra de pólen apícola orgânico desidratado

Análises	Pólen apícola	
	Amostra	Legislação brasileira*
Atividade de água (Aw)	0,42 ± 0,01**	-
Umidade (%)	7,44 ± 0,23	Máximo 4%
Cinzas (%)	2,22 ± 0,04	Máximo 4%
Proteína (%) (N x 6,25)	21,35 ± 0,11	Mínimo 8%
Lipídeos (%)	4,64 ± 0,11	Mínimo 1,8%
Fibras (%)	4,36 ± 0,16	Mínimo 2%
Glicídios redutores em glicose (%)	11,70 ± 0,14	-
Glicídios não redutores em sacarose (%)	3,80 ± 0,14	-
Açúcares totais (%)	15,50 ± 0,28	14,5 a 55%

*BRASIL (2001). **Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão.

A legislação brasileira, não estabelece parâmetros para a atividade de água em amostras de pólen, mas, acredita-se que esse dado possa ser utilizado para avaliar a qualidade do produto, visto que, a maioria dos micro-organismos que causam deterioração possuem dificuldades de se desenvolver em produtos com Aw inferiores a 0,90. O pólen apícola orgânico desidratado apresentou valor de Aw de 0,42 (Tabela 4). Este parâmetro é muito importante na determinação da estabilidade

de certos alimentos processados, refletindo o grau de ligação da água aos componentes do material, não se encontrando disponível para as reações bioquímicas (oxidação lipídica, reações enzimáticas, etc.) e para o crescimento de micro-organismos (CERESER et al., 2008).

Barreto; Funari e Orsi (2005) consideram que para o pólen ser desidratado a atividade de água deve ser de aproximadamente 0,42 a 0,57 (A_w), portanto a amostra analisada pode ser considerada desidratada e com boa estabilidade de armazenagem. Resultado semelhante aos observados em amostras de pólen apícola desidratado da região Sul do Brasil, em que a atividade de água média foi de 0,38, e o valor médio da A_w das amostras de pólen apícola de União da Vitória, Paraná que foi de 0,40 (CARPES et al., 2009). No estado de Sergipe, a média estadual da atividade de água foi 0,446 (CORREIA-OLIVEIRA et al., 2008), enquanto, no pólen apícola de Portugal a A_w variou de 0,32 a 0,55 (ESTEVINHO et al., 2012).

Com relação à umidade, o valor encontrado foi 7,44%, e está em desacordo com a legislação brasileira que estabelece o máximo de 4% para o pólen apícola desidratado (BRASIL, 2001). Carpes et al. (2009) analisaram 36 amostras de pólen apícola desidratado da Região Sul, e obtiveram o valor médio de 4,19%. Arruda et al. (2013), ao analisar sete amostras de pólen apícola desidratado coletado na cidade de Pariquera-Açu, São Paulo encontraram valor médio de umidade de 3,47%. Enquanto Pinto, Campos e Barreto (2012), em amostras de pólen apícola desidratado coletada em Taubaté, São Paulo encontraram uma média de 1% de umidade.

Melo e Almeida-Muradian (2011) determinaram o teor de umidade em amostras de pólen apícola desidratadas, utilizando diferentes métodos e observaram menor eficiência no método tradicional (estufa 105 °C), com um teor médio de umidade de 10,02%. De acordo com Marchini, Reis e Moreti (2006), uma pequena variação do teor de umidade pode ser explicada porque o pólen é altamente higroscópico e influenciado pelo tipo de embalagem utilizada, além das condições de armazenamento, tais como a temperatura e umidade relativa do ambiente. A legislação brasileira estabelece os parâmetros a serem avaliados, bem como o limite para ser seguido, no entanto, não são especificados quais os métodos a ser utilizados para avaliar a qualidade do pólen apícola.

O resultado encontrado para cinzas foi de 2,22%, estando próximo aos resultados encontrados por Arruda et al. (2013) em Pariquera-Açu, São Paulo e Barreto et al. (2006) em várias regiões do Brasil que obtiveram os valores de 2,98% e 2,89% respectivamente.

O conteúdo total de proteínas foi de 21,35%, este resultado foi semelhante ao encontrado por Carpes et al. (2009), onde o teor médio de proteína foi de 21,97% para as amostras de pólen também coletadas no município de União da Vitória-PR. Arruda et al. (2013), analisaram o pólen apícola de Pariquera-Açu, estado de São Paulo e encontraram 23,38% de proteínas. No entanto, teores mais elevados de proteína, acima de 25%, já foram encontrados em pólen apícola produzido em Taubaté-SP (PINTO; CAMPOS; BARRETO, 2012) e no pólen de Minas Gerais (MODRO et al., 2007). A maior parte do nitrogênio presente no pólen está na fração proteica, sendo este um dos grupos de nutrientes mais abundantes.

O teor de lipídeos foi de 4,64%, valor similar ao encontrado por Carpes et al. (2009) (4,98%) em amostras provenientes do mesmo local do presente estudo, e ao relatado por Pinto, Campos e Barreto (2012) para amostras de Taubaté-SP (4,4%). Outras amostras de pólen apícola desidratadas, obtidas em Piracicaba-SP analisadas por Silveira (2012), ou ainda algumas amostras de Minas Gerais, avaliadas por Modro et al. (2007), apresentaram valores mais baixos: 3,73% e 2,44%, respectivamente. Já os estudos de Almeida-Muradian et al. (2005) e Arruda et al. (2013) relataram valores mais altos do que o apresentado neste trabalho, 7,0% e 5,39%.

Para fibra bruta, a amostra avaliada apresentou 4,36%, demonstrando-se ligeiramente maior que os 3,71% relatados por Carpes et al. (2009) na avaliação de amostras de pólen também coletadas em União da Vitória-PR.

A amostra de pólen apícola orgânico apresentou valor de 15,5% de açúcares totais. O teor de açúcares redutores (11,70%) da amostra pode ser justificado pela presença de mel ou néctar nos grãos de pólen. Além disso, o conteúdo de carboidratos presentes no pólen pode estar relacionado com os açúcares presentes no néctar das flores (QIAN et al., 2008; GRAIKOU et al., 2011).

Os minerais predominantes na amostra foram o magnésio (12,14 mg/g de pólen), seguido pelo cálcio (11,19 mg/g de pólen), potássio (3,56 mg/g de pólen) e manganês (1,67 mg/g de pólen) (Tabela 5).

Morgano et al. (2012) ao investigar a composição mineral do pólen apícola brasileiro, encontraram como minerais predominantes K, P, Ca e Mg e em menores proporções Na, Fe, Mn, Zn, Cu e Se, e as amostras do estado do Paraná apresentaram níveis mais elevados de Mg. Em outros países como Transilvânia área da Romênia, Stanciu et al. (2011) encontraram em todas as amostras de pólen apícola testadas maior concentração de potássio, seguido de cálcio e magnésio.

Tabela 5 - Conteúdo mineral da amostra de pólen apícola orgânico desidratado

Minerais	Resultados*
Ferro	0,05 ± 0,01
Sódio	0,36 ± 0,03
Potássio	3,56 ± 0,22
Cálcio	11,19 ± 0,23
Magnésio	12,14 ± 0,45
Zinco	0,05 ± 0,01
Cobre	0,77 ± 0,09
Manganês	1,67 ± 0,09

* mg/g de pólen apícola. Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão.

A composição mineral do pólen apícola não depende somente da origem floral do pólen, mas também das condições de crescimento da planta, como solo e origem geográfica. Segundo Stanley e Linskens (1974) há diferenças no conteúdo mineral do pólen coletado pelas abelhas e o pólen coletado diretamente da flor, e somente Ca e Mg tiveram valores similares em ambos os tipos de pólen. Silva et al. (2012), em estudo sobre o conteúdo de Cu, Mn, Pb e Zn no solo, plantas e pólen apícola do município de Teresina, estado do Piauí, concluíram que no pólen apícola, há translocação de minerais a partir do solo, principalmente de Mn e Zn.

Conforme a RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005) que regulamenta a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais, e de acordo com a Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998 (BRASIL, 1998), para que um alimento seja considerado fonte ou rico em um determinado micronutriente, o mesmo deve estar presente, respectivamente, nas quantidades correspondentes à 15% e 30% do peso total da porção, a porção diária

recomendada para o consumo de pólen apícola é 25 g (BASTOS et al., 2003). Portanto, a amostra de pólen apícola analisada pode ser considerada fonte de Ca e Zn, e rica em Mg, Cu e Mn. Além disso, o alto teor de proteína e açúcares redutores e o baixo teor de lipídios fazem do pólen apícola um excelente suplemento alimentar.

5.2 CARACTERIZAÇÃO PALINOLÓGICA DO PÓLEN APÍCOLA

A análise polínica permite a identificação das maiores fontes poliníferas utilizadas pelas abelhas, bem como, os períodos de produção de pólen no campo e as épocas de escassez (MORETI et al., 2002). De acordo com Barth (2004), estudos sobre análise polínica de produtos apícolas na região sul do Brasil não são frequentes. A maioria dos pólenes de abelhas da região Sul do Brasil são considerados heteroflorais uma vez que eles carregam pólen de *Myrtaceae eucalyptus* e famílias *Asteraceae* e *Brassicaceae*, entre outras (Carpes et al., 2009). De acordo com Moreti et al. (2002), o mel produzido na região sul do Brasil foi predominantemente de *Asteraceae* (Compositae).

Almeida-Muradian et al. (2005), analisaram a taxonomia botânica de dez amostras de pólen apícola da região Sul do Brasil, e observaram que todas as amostras apresentaram mais de uma característica taxonômica, embora os produtores designaram como monofloral. Os autores concluíram que o fato de pellets de pólen apresentar apenas uma cor, não significa necessariamente que ele é monofloral. No entanto, é mais suscetível ser de um mesmo táxon botânico, quando comparado com amostras de cores diferentes.

Os pellets de pólen analisados nesse estudo apresentaram uma mistura de tipos polínicos, cuja coloração variou de amarelo claro para laranja ou até mesmo cores mais escuras, como marrom. Foram identificados três tipos polínicos (Tabela 6), portanto a amostra foi classificada como heterofloral.

Tabela 6 - Tipos polínicos observados na amostra de pólen apícola orgânico desidratado

* Imagem	Tipos polínicos (família/gênero)	Classificação
A	<i>Asteraceae baccharis</i>	PD
B	<i>Anacardiaceae</i> Tipo II	PA
C	<i>Asteraceae eupatorium</i>	PII

* Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); PD = pólen dominante (> 45%); PA = pólen acessório (15 - 45%); PII = pólen isolado importante (3 - 15%).

A amostra avaliada continha o pólen de *Asteraceae baccharis* (Tabela 6, Figura 15, imagem A) como dominante (> 45%), foi detectado na categoria pólen acessório (15-45%) *Anacardiaceae* Tipo II (Tabela 6, Figura 15, imagem B) e como pólen isolado importante (3-15%) foi observado o tipo *Asteraceae eupatorium* (Tabela 6, Figura 15, imagem C).

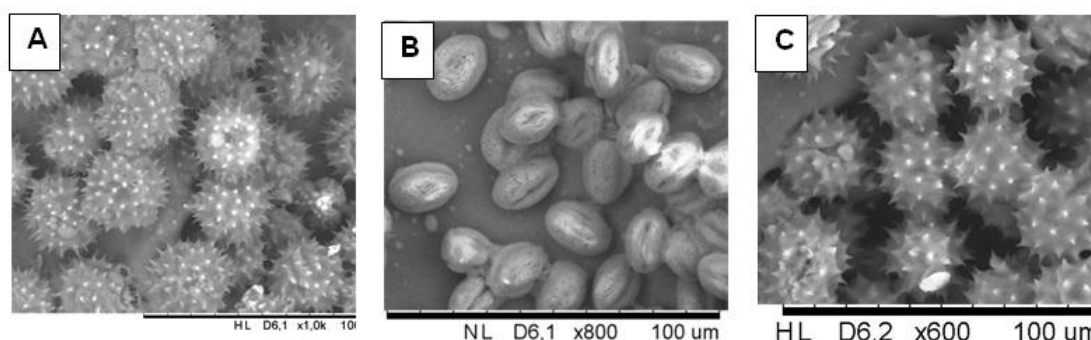


Figura 15 - Tipos polínicos observados na amostra de pólen apícola orgânico de União da Vitória, PR

Imagens: A. *Asteraceae baccharis*; B. *Anacardiaceae* Tipo 2; C. *Asteraceae eupatorium*.

Analisando os tipos polínicos de 36 amostras de pólen apícola do sul do Brasil, seis do município de União da Vitória - PR, Carpes et al. (2009) encontraram uma única amostra monofloral contendo exclusivamente o pólen do tipo *Asteraceae baccharis* em sua composição. No entanto, as outras cinco amostras foram classificadas como heteroflorais, com o pólen predominante do tipo *Asteraceae eupatorium*. Os autores também observaram a presença de *Asteraceae gochnatia*, *Asteraceae elephantopus*, *Anacardiaceae schinus*, *Anacardiaceae astronium*, *Myrtaceae eucalyptus*, *Mimosaceae mimosa* e *Brassicaceae*. Estes resultados são semelhantes aos do presente estudo, efetuados no mesmo município e com as mesmas famílias predominantes, no entanto, o número de espécies botânicas foi

menor. Estas divergências podem ser explicadas pela sazonalidade de algumas espécies botânicas e a presença de áreas cultivadas na região.

Estudos com análise polínica de pólen apícola em outras regiões brasileiras, como em Dourados no Mato Grosso do Sul, D’Apolito et al. (2010) encontraram *Myrtaceae*, *Asteraceae*, *Euphorbiaceae*, *Brassicaceae* e *Poaceae* como sendo as famílias mais importantes. Enquanto no Pantanal no sul de Mato Grosso do Sul, *Fabaceae*, *Asteraceae*, *Rubiaceae*, *Euphorbiaceae* e *Arecaceae* foram às famílias cujas flores foram mais utilizadas pelas abelhas *A. melífera* (BOFF et al., 2011). No Estado da Bahia, Freire et al. (2012) identificaram os tipos de pólen de *Cecropia*, *Eucalyptus*, *Elaeis*, *Mimosa pudica*, *Eupatorium* e *Scoparia*. Na região da Caatinga, Bahia, 36 famílias botânicas foram encontradas em tipos de pólen apícola com 85 diferentes tipos de pólen, e a família *Fabaceae* foi a mais predominante (NOVAIS; LIMA; SANTOS, 2010).

Modro et al. (2007) analisaram a composição e qualidade do pólen apícola coletado de dois apiários em Minas Gerais, o primeiro apiário mostrou predominância de tipos polínicos de espécies ornamentais, como *Arecaceae sp.*, Enquanto no segundo apiário, as espécies herbáceas de pasto abandonado, como *Eupatorium sp.* foram encontrados. Arruda et al. (2013) em Pariquera-Açú, São Paulo, verificaram com maior ocorrência a presença do tipo *Arecaceae* que aparece nas proporções de pólen dominante ou isolado importante, em todos os lotes, exceto em um lote que apareceu como pólen isolado ocasional (<3%).

De acordo com Luz et al. (2010), as variações entre os tipos polínicos observados nos pellets de pólen de mesma região ou estados podem ser explicadas devido à sazonalidade de algumas espécies botânicas, das áreas cultivadas na região ou da vegetação nas redondezas do apiário, assim como das condições climáticas para a floração.

5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EEM E DO EEP

5.3.1 Compostos fenólicos e flavonoides totais do EEM e do EEP

Os compostos fenólicos podem contribuir diretamente com a ação antioxidante, devido às suas propriedades redox, que lhes permitem atuar como agentes redutores, doadores de hidrogênio e oxigênio singleto (NEGRI et al., 2011).

O teor de compostos fenólicos totais, determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, para os extratos de pólen apícola orgânico e de manjerona foram de 19,69 mg EAG/g e 41,56 mg EAG/g de amostra, respectivamente (Tabela 7), usando uma curva padrão de ácido gálico ($R^2=0,999$). Os teores de flavonoides totais expressos em equivalentes de quercetina foram de 6,81 mg quercetina/g para o pólen e 11,28 mg de quercetina/g de amostra para manjerona, usando uma curva padrão de quercetina ($R^2=0,993$) (Tabela 7).

Nota-se que houve diferença significativa ($p<0,05$) entre as amostras, tanto para os compostos fenólicos quanto para os flavonoides, e a amostra de manjerona que apresentou o maior teor de compostos fenólicos (41,56 mg EAG/g de manjerona) também apresentou o maior teor de flavonoides (11,28 mg de quercetina/g de manjerona) (Tabela 7).

Tabela 7 - Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais do EEM e EEP

Amostras	Fenólicos totais (mg EAG*/g de amostra)**	Flavonoides totais (mg quercetina/g de amostra)**
Manjerona	41,56 ^a ± 0,16	11,28 ^a ± 0,02
Pólen apícola	19,69 ^b ± 0,14	6,81 ^b ± 0,05

*EAG: Equivalente em ácido gálico. **Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão. Médias seguidas de letra diferente na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Silva et al. (2012) estudando extratos etanólicos (70%) de manjerona também oriunda de Pato Branco-PR obtiveram teor de compostos fenólicos de 41,24 mg EAG/g, valor próximo ao encontrado no presente estudo (41,56 mg EAG/g

de manjerona) e superior ao encontrado por Pinheiro et al. (2011), 15,73 mg EAG/g em extrato hidro alcoólico (80%) de manjerona da cidade de Cascavel-PR. Roby et al. (2013), avaliaram a manjerona proveniente do Egito e no extrato etanólico obtiveram 4,65 mg EAG/g de extrato seco.

Teores mais elevados de compostos fenólicos totais, acima de 45 mg EAG/g, foram encontrados em manjerona oriunda de Piracicaba-SP, cujo os extratos foram extraídos utilizando etanol 80% (v/v) (RAVELLI, 2011) e em extrato ultrassônico de manjerona oriunda da Turquia (HOSSAIN et al., 2012). Chan et al. (2012) ao estudar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em extratos metanólicos de manjerona da Malásia, obtiveram 5530 mg EAG/100 g e 1580 mg de quercetina/100 g de amostra, respectivamente.

De acordo com Poiroux-Gonord et al. (2010), estas variações são provavelmente atribuídas a cultivar, o efeito do genótipo, a sazonalidade, as condições de crescimento e época de colheita da planta, que influenciam as concentrações de fenólicos numa variedade de plantas.

Os resultados obtidos para amostra de pólen apícola, compostos fenólicos (19,69 mg EAG/g) e flavonoides totais (6,81 mg quercetina/g de pólen apícola) (Tabela 7) encontram-se superiores aos de Neves; Alencar e Carpes (2009) os quais analisaram extratos etanólicos (70%) de pólen apícola oriundos do Sudeste e Nordeste do Brasil e encontraram 6,9 mg a 13,78 mg EAG/g para fenólicos e 3,46 mg a 6,87 mg de quercetina/g de pólen para flavonoides, e aos de Moraes et al. (2011) que encontraram nos extratos hidro metanólicos de pólen apícola de cinco Parques Nacionais de Portugal, valores que variaram entre 10,5 mg e 16,8 mg EAG/g. Negri et al. (2011) encontraram o teor de compostos fenólicos de sete amostras de pólen do Sudeste do Brasil, variaram de 1,6 a 2,3 mg EAG/g de pólen.

Porém estes resultados foram inferiores aos reportados por Freire et al. (2012), que analisaram pólen apícola do município de Canavieiras-BA e encontraram 41,5 mg a 213,2 mg EAG/g de pólen, e Cheng et al. (2013) que encontraram 53,74 mg EAG/g de pólen nos extratos de pólen de *Schisandra chinensis*.

Em estudos anteriores, Leblanc et al. (2009) analisaram os compostos fenólicos e flavonoides de 6 tipos polínicos, os teores de fenólicos variaram de 15,91 mg a 34,85 mg EAG/g, e os teores de flavonoides totais de 2,66 mg a 5,48 mg de quercetina/g de pólen, e em amostras de pólen apícola da Região Sul do Brasil, os

teores de compostos fenólicos variaram de 19,28 mg a 48,90 mg EAG/g, e os teores de flavonoides variaram de 2,10 mg a 28,33 mg de quercetina/g de pólen (Carpes et al., 2009).

De modo geral, as quantidades variadas de compostos fenólicos em amostras de pólen apícola entre os estudos mencionados, podem estar associadas à sua característica botânica e origem geográfica da planta visitada pelas abelhas. Além disso, as formas e condições de extração, bem como os solventes empregados influenciam na composição química da amostra.

5.3.2 Determinação de compostos fenólicos por CLAE-FR

Os compostos fenólicos do EEP e EEM foram individualmente determinados por CLAE-FR. A identificação dos compostos foi realizada utilizando detector de arranjo de diodo comparando-se o tempo de retenção, o espectro de absorção e co-cromatografia com os padrões disponíveis. Os resultados da análise quantitativa e qualitativa encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Compostos fenólicos identificados no EEP e EEM por CLAE-FR

Compostos fenólicos	T _R (min)*	(mg/g)	
		EEP	EEM
Ácido cafêico	13,90	-	0,007
Ácido <i>p</i> -cumárico	18,56	0,238	0,037
Ácido ferúlico	20,03	0,011	-
Rutina	25,16	0,015	0,078
Miricetina	28,25	0,037	-
Ácido trans-cinâmico	32,51	0,271	-
Quercetina	33,61	0,317	0,009
Canferol	37,02	0,682	0,065

*T_R: Tempo de Retenção em minutos.

O perfil cromatográfico do EEP e EEM indicou a presença de oito compostos. Ácidos fenólicos (ácido cafêico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido trans-cinâmico) e flavonoides (rutina, miricetina, quercetina e canferol) foram encontrados nos extratos de pólen e manjerona (Tabela 8). Os cromatogramas representativos com absorção de 280 nm são mostrados na Figura 16.

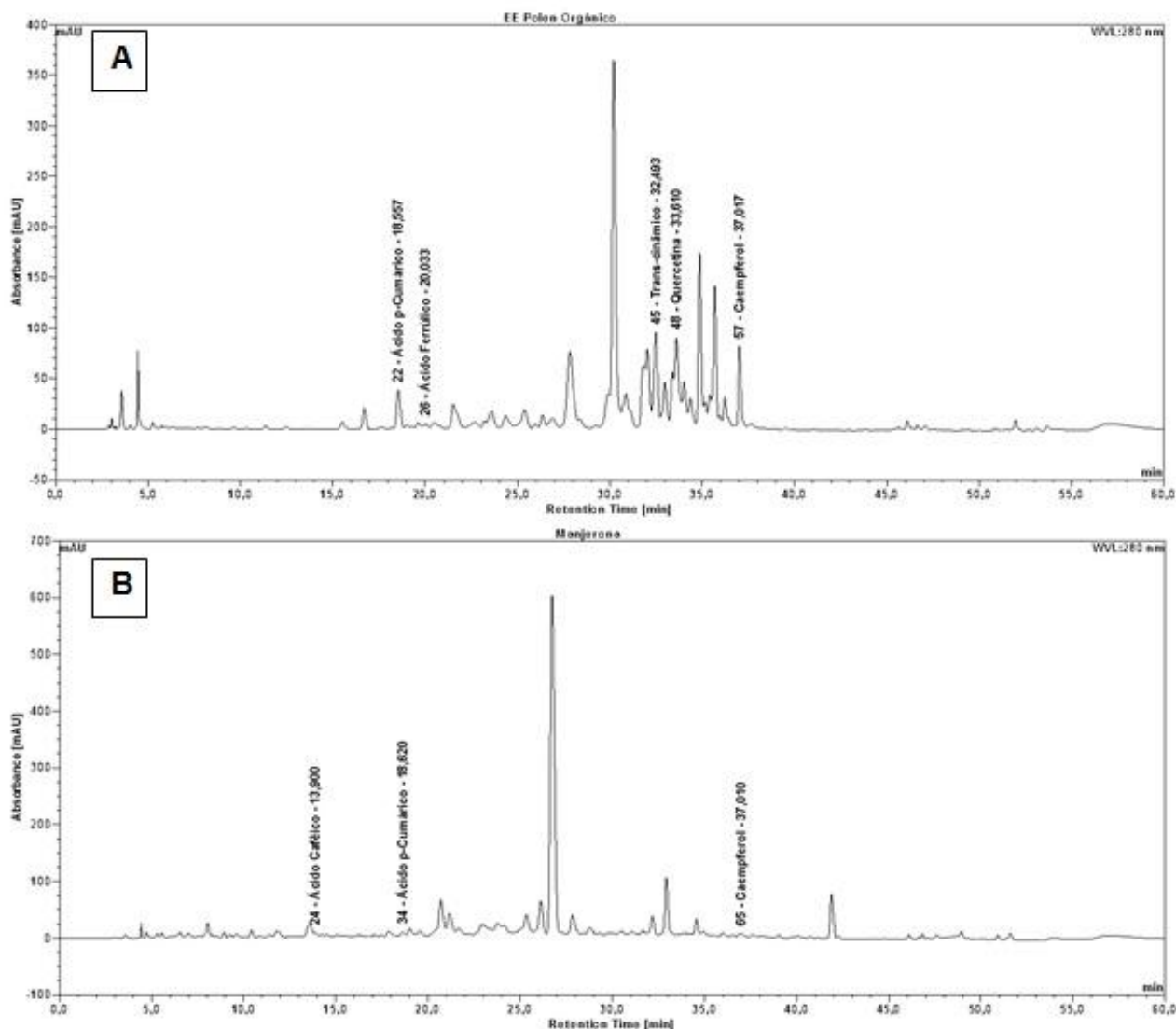


Figura 16 - Cromatogramas em CLAE dos extratos de etanólicos de pólen apícola (A) e manjerona (B)

Foi demonstrado apenas o cromatograma com espectro de absorção de 280 nm (Figura 16) devido à maioria dos compostos serem identificados neste comprimento de onda. Entretanto, alguns compostos como rutina e miricetina não foram identificados em λ 280 nm, somente à λ 320 e 370 nm (cromatogramas não exibidos).

O cromatograma referente ao pólen apícola apresentou um maior número de picos (Figura 16, A). O teor de canferol foi o mais elevado entre os compostos fenólicos identificados, seguido por quercetina e ácido trans-cinâmico.

Pinto et al. (2010) analisaram a composição química do pólen apícola de *Cystus incanus* e *Salix alba* da Croácia, por CLAE, e detectaram nove compostos fenólicos, entre eles pinocembrin, crisina, galangina, isoramnetina, quercetina, canferol, ácido cumárico, taxifolina e ácido cafêico.

Freire et al. (2012) detectaram os flavonoides isoquercetina, miricetina, tricetin, quercetina, luteolina, selagin, canferol e isoramnetina em pólen apícola de Canavieiras-BA (nordeste do Brasil). Cheng et al. (2013) identificaram nove compostos fenólicos no extrato de pólen apícola de *Schisandra chinensis* da China, entre eles cinco foram flavonoides como: resveratrol, quercetina, hesperetina, canferol, galangina e os ácidos fenólicos ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido vanílico e ácido *p*-cumárico; demonstrando que a alta atividade antioxidante do pólen está relacionada com os flavonoides.

Verificou-se que os flavonoides canferol e quercetina presentes no pólen analisado, foram também encontrados nos trabalhos mencionados, porém, os autores não detectaram no pólen alguns compostos como ácido trans-cinâmico, ácido ferúlico e rutina.

Na amostra de manjerona foi possível identificar o ácido cafêico, ácido *p*-cumárico e canferol (Figura 16, B). Hossain et al. (2012) avaliaram o perfil de compostos fenólicos no extrato ultrassônico de manjerona oriunda da Turquia, estes autores verificaram a presença dos compostos ácido rosmarínico, luteolina-7-O-glicosídeo, apigenina-7-O-glicosídeo, ácido cafêico, ácido carnósico e carnosol.

Roby et al. (2013), analisaram qualitativamente e quantitativamente por CLAE, os compostos fenólicos presentes no extrato metanólico de manjerona proveniente do Egito, extraídos à temperatura ambiente por 72h. Foram identificados os compostos fenólicos: ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafêico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido rosmarínico, rosmarinato de metila, apigenina e luteolina-7-O-rutinose.

Embora o ácido rosmarínico tenha sido identificado nos trabalhos mencionados, este composto não foi identificado na amostra estudada. Enquanto, os flavonoides canferol, quercetina e rutina foram detectados na manjerona estudada e não constatados nos estudos citados. Entretanto, coincidiram entre os estudos os

compostos ácido *p*-cumárico e ácido cafêico, este último possui em sua estrutura duas hidroxilas nas posições 3 e 4, o que indica alto potencial antioxidante, sendo sua atuação antioxidante maior que a do BHT (SOARES, 2002).

De modo geral, as quantidades variadas, a presença ou ausência de alguns compostos fenólicos nas amostras entre os estudos mencionados, podem estar associadas ao tempo e temperatura de extração. Outro fator que pode interferir no perfil químico é o solvente utilizado na extração dos compostos fenólicos, bem como a origem das amostras, no caso do pólen apícola a característica botânica e origem geográfica da planta visitada pelas abelhas.

A presença de ácidos fenólicos como o ácido cafêico na manjerona, justifica sua ação antioxidante; e flavonoides como a quercetina indica a qualidade nutricional e biológica do pólen, em função de sua elevada atividade antioxidante. De acordo com Lee et al. (2010), entre os compostos fenólicos identificados e quantificados, a quercetina devido à atividade antioxidante tem sido investigada e mostrou possuir efeitos hepatoprotetores.

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EEM E DO EEP

5.4.1 Atividade de sequestro do radical DPPH^{*}

A atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH^{*} foi expressa em termos de IC₅₀, ou seja, a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH inicial da reação no tempo em que o extrato atingiu a estabilidade. Quanto menor o seu valor, maior é a capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos (KULISIC; DRAGOVIC-UZELAC; MILOS, 2006).

A Figura 17 apresenta um exemplo do cálculo da meia vida (IC₅₀) feita por meio de uma equação de regressão. Partindo-se do princípio de que a reação dos compostos fenólicos com o radical DPPH^{*} é de primeira ordem, foram plotados gráficos que expressam a atividade antioxidante pelo tempo utilizando a fórmula citada por Mensor et al. (2001) (Eq. 1).

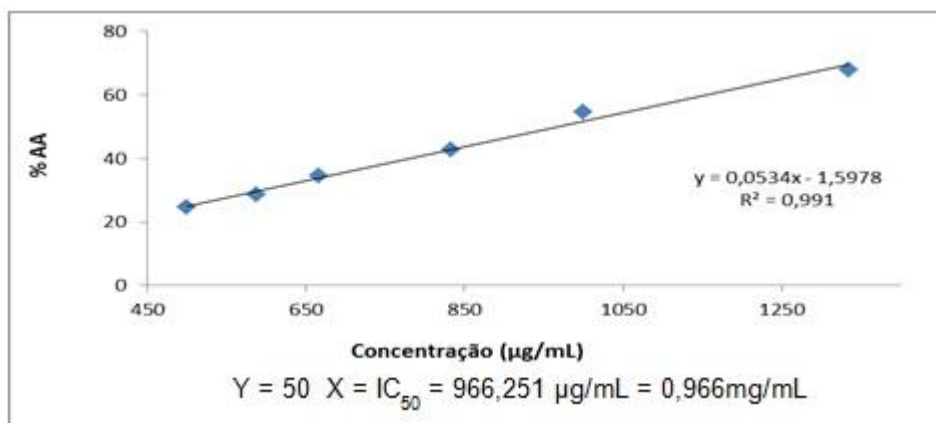


Figura 17 - Exemplo de gráfico para o cálculo do IC₅₀

Os valores de IC₅₀ para os extratos de manjerona e de pólen apícola orgânico foram de 395,83 µg/mL e 966,21 µg/mL, respectivamente (Tabela 9). Notou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os extratos, tanto para os valores de IC₅₀ quanto para a porcentagem de atividade antioxidante.

Tabela 9 - Atividade de sequestro do radical DPPH: IC₅₀ e porcentagem de atividade antioxidante

Amostras	IC ₅₀ (µg/mL)*	% AA*
Manjerona**	395,83 ^d ± 1,63	91,04 ^a ± 1,81
Pólen apícola**	966,21 ^e ± 0,95	54,42 ^c ± 0,23
α-tocoferol***	61,22 ^a ± 0,04	90,52 ^a ± 0,06
BHA***	72,25 ^b ± 0,06	73,69 ^b ± 0,13
BHT***	114,66 ^c ± 0,07	52,37 ^c ± 0,11

*Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. ** 1000 µg/mL. *** 100 µg/mL.

Entre os extratos analisados, o EEM apresentou o menor valor de IC₅₀ e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante em termos de sequestro do radical DPPH. Comparando-se o valor de IC₅₀ obtido (395,83 µg/mL) para o EEM (Tabela 9), com outros extratos hidro alcoólicos de manjerona de Cascavel-PR analisados por Pinheiro et al. (2011), de Pato Branco-PR avaliados por Silva et al. (2012), ou ainda de Kaunas na Lituânia, estudados por Damasius et al. (2011) apresentaram valores de IC₅₀ mais altos: 6070,00 µg/mL, 472,55 µg/mL e 0,74 mg/mL,

respectivamente, e conseqüentemente menor atividade antioxidante em termos de sequestro do radical livre DPPH^{*}, do que o encontrado no presente estudo.

Os resultados da atividade antioxidante do EEP apresentados neste estudo (Tabela 9) foram superiores aos encontrados por Morais et al. (2011), que analisaram cinco amostras de pólen apícola de diferentes parques naturais de Portugal onde os valores de IC₅₀ variaram de 2160 a 5870 µg/mL. Superiores também às amostras de pólen da Região Sul do Brasil, os valores de IC₅₀ variaram de 810 a 4690 µg/mL, com um valor médio de 1920 µg/mL, sendo que as amostras de pólen oriundas de União da Vitória-PR coletadas em 2007 apresentaram valor de IC₅₀ de 1180 a 4030 µg/mL (CARPES et al., 2008). Porém inferior ao valor de IC₅₀ 181,4 µg/mL, encontrado por Graikou et al. (2011) em extrato metanólico de pólen apícola grego.

A atividade de sequestro do radical livre DPPH foi também expressa em termos de porcentagem de atividade antioxidante. Neste estudo, após 80 minutos de reação, o EEM e o EEP, foram avaliados na concentração de 1000 µg/mL, e os percentuais de atividade antioxidante (%AA) foram de 91,04% e 54,42%, respectivamente (Tabela 9).

Dentre os extratos estudados, o maior %AA foi verificado na manjerona 91,04%, e este foi superior ao encontrado por Ravelli (2011), 85,12% no extrato bruto de manjerona de Piracicaba-SP. Superior também ao encontrado por Pinheiro et al. (2011) 61,72% (2670 µg/mL), por Silva et al. (2012) 86,90% na concentração de 890 µg/mL e por Abdel-Massih et al. (2010) 82% no extrato hidroalcoólico de manjerona oriunda do Líbano.

A porcentagem de atividade antioxidante do pólen apícola orgânico (54,42%) encontra-se de acordo com a faixa de valores obtidos por Carpes et al. (2008) entre 30,54% a 94,73% que avaliou 36 amostras de pólen apícola da região Sul do Brasil, e dentro dos percentuais obtidos por Menezes et al. (2010) entre 37,94% a 93,21%, que avaliaram 33 amostras de pólen apícola da região de Alagoinhas-BA.

Os extratos foram comparados com os antioxidantes comerciais α -tocoferol, BHA e BHT, que foram utilizados como padrões de referência. Os valores de IC₅₀ e os percentuais encontrados para os controles positivos α -tocoferol, BHA e BHT, estão apresentados na Tabela 9. O α -tocoferol apresentou o menor valor de IC₅₀ e o maior percentual entre os controles positivos avaliados.

Os extratos analisados apresentaram atividade antioxidante inferiores aos controles positivos testados. Entretanto, por se tratar de produto natural, com maior aceitação pelo consumidor podem ser utilizados em alimentos em concentrações maiores para atingir os efeitos desejados.

5.4.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS⁺

A atividade antioxidante dos extratos foi também determinada pelo método de sequestro do radical ABTS⁺ (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6- sulphonic acid) e foram expressas em μmol de TEAC (capacidade antioxidante equivalente em Trolox)/g. O método ABTS⁺ tem sido amplamente utilizado na avaliação da atividade antioxidante em alimentos e bebidas, devido a sua aplicabilidade na fase aquosa.

Na Tabela 10, podem-se visualizar os resultados da atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) pelo método ABTS⁺. Os ensaios foram realizados com diluição 1:20 para o EEM e 1:10 para o EEP.

Os resultados da atividade antioxidante equivalente ao Trolox para os extratos de pólen apícola orgânico e de manjerona foram de 120,10 μmol TEAC/g e 225,52 μmol TEAC/g de amostra, respectivamente (Tabela 10). Verificou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras.

Tabela 10 - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox pelo método ABTS⁺

Amostras	Atividade antioxidante (μmol TEAC*/g)**
Manjerona	225,52 ^d \pm 1,73
Pólen apícola	120,10 ^d \pm 0,21
α -tocoferol	5270,03 ^a \pm 97,27
BHA	4743,04 ^b \pm 236,37
BHT	4277,33 ^c \pm 73,53

*TEAC: Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox. **Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão. Médias seguidas de letra diferente na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Entre os extratos, o melhor resultado encontrado neste trabalho para a metodologia do ABTS^{•+} foi no extrato de manjerona (225,52 $\mu\text{mol TEAC/g}$). No entanto, alguns autores obtiveram resultados superiores, Mariutti et al. (2008) no extrato etanólico de manjerona de São Paulo-SP: 25000 $\mu\text{mol TEAC/g}$, e Özyürek et al. (2008), em extrato metanólico de manjerona da Turquia: 449 $\mu\text{mol TEAC/g}$ da especiaria.

Marghitas et al. (2009) ao analisarem a atividade antioxidante de amostras de pólen apícola da Romênia pela metodologia do ABTS, obtiveram valores entre 546 a 6838 $\mu\text{mol Trolox/g}$, e estes por sua vez, apresentaram-se superiores em relação a amostra de pólen analisada no presente estudo.

Os extratos foram comparados com os antioxidantes comerciais α -tocoferol, BHA e BHT, que foram utilizados como padrões de referência, sendo estes analisados na concentração final de 100 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados destes antioxidantes comerciais encontram-se na Tabela 10. O α -tocoferol apresentou a melhor capacidade antioxidante equivalente ao Trolox, entre os controles positivos avaliados.

Os extratos analisados apresentaram capacidade antioxidante inferiores aos controles positivos testados. Entretanto, estas substâncias são puras e reconhecidas como antioxidantes de alta capacidade de sequestro de radicais livres.

5.4.3 Atividade antioxidante através da redução do ferro - FRAP

Os extratos etanólicos das amostras também foram avaliados quanto a sua atividade antioxidante pelo método FRAP, que é o método da redução do ferro. Este método é utilizado para se avaliar a atividade antioxidante de compostos fenólicos de plantas e alimentos, pois é relativamente simples. Nele é determinado o potencial de um antioxidante em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} na presença de TPTZ, que em condições ácidas é acompanhada pela formação de um complexo azul intenso (RUFINO et al., 2006).

Os resultados da atividade antioxidante pela redução do ferro para os extratos de pólen apícola orgânico e manjerona foram de 60,64 $\mu\text{mol de Fe}^{2+}/\text{g}$ e

216,79 μmol de Fe^{2+}/g de amostra, respectivamente (Tabela 11). Verifica-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras.

Tabela 11 - Atividade antioxidante pela redução do ferro (FRAP)

Amostras	Atividade antioxidante (μmol de Fe^{2+}/g)*
Manjerona	216,79 ^d \pm 0,84
Pólen apícola	60,64 ^e \pm 0,63
α -tocoferol	1328,80 ^c \pm 22,09
BHA	2717,79 ^a \pm 571,46
BHT	2310,11 ^b \pm 70,59

*Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão. Médias seguidas de letra diferente na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Entre os extratos, o que conseguiu reduzir maior quantidade de Fe^{3+} em Fe^{2+} foi o de manjerona (216,79 μmol de Fe^{2+}/g). Em estudos de Hossain et al. (2011) em extrato metanólico de manjerona da Irlanda encontraram pelo método FRAP 12,26 g Trolox/100 g de extrato seco. E em extrato ultrassônico de manjerona oriunda da Turquia, obtiveram pelo método do FRAP o valor de 17,08 g Trolox/100 g de extrato seco (HOSSAIN et al., 2012). Esses resultados são expressos de maneira diferente (g Trolox/100 g), tornando difícil a comparação entre resultados. Estudos na literatura que descrevem a atividade antioxidante de extrato de manjerona pelo método FRAP expressos em μmol de Fe^{2+}/g , são escassos.

A atividade antioxidante pela redução do ferro para o extrato de pólen apícola orgânico foi de 60,64 μmol de Fe^{2+}/g (Tabela 11). Enquanto Leblanc et al. (2009) ao analisar seis extratos etanólicos de pólen apícola dos Estados Unidos, encontraram pelo ensaio FRAP, valor médio de 1,53 mM [Fe^{2+}]. Marghitas et al. (2009), ao avaliar doze extratos metanólicos de pólen apícola da Transilvânia área da Roménia, constataram valores de FRAP entre 0,255 a 5,355 mmol Fe^{2+}/g .

Os extratos foram comparados com o antioxidante natural α -tocoferol e com os antioxidantes sintéticos BHA e BHT, que foram utilizados como padrões de referência, sendo estes analisados na concentração final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os resultados pelo método FRAP para os antioxidantes comerciais encontram-se na

Tabela 11. Entre os controles positivos testados, o que conseguiu reduzir maior quantidade de Fe^{3+} em Fe^{2+} foi o BHA.

Quando se compara os valores de FRAP obtidos neste estudo com os valores dos padrões sintéticos ou com o α -tocoferol, observa-se que as amostras apresentam capacidade antioxidante inferiores a eles. Entretanto, estas substâncias são puras e reconhecidas pelo alto poder antioxidante.

5.4.4 Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

No sistema β -caroteno/ácido linoleico a atividade de uma amostra ou composto em proteger um substrato lipídico é determinada através da atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. A presença de antioxidantes no sistema protege o ácido linoleico e prolonga o período de formação de radicais livres (CARPES et al., 2008). Segundo Kulisic; Dragovic-Uzelac; Milos (2006) quanto menor for a redução da densidade óptica da amostra (avaliada pelo descoramento do β -caroteno), maior é a inibição da degradação de β -caroteno e conseqüentemente maior é a atividade antioxidante desta amostra.

Um dos fatores que podem influenciar nesta análise é o meio onde ocorre a reação, que se caracteriza por uma emulsão, apresentando regiões polares e apolares ao mesmo tempo. Dependendo da polaridade da amostra, esta pode interagir de forma mais intensa ou menos intensa com a emulsão (TIVERON, 2010).

A Tabela 12 mostra os resultados da atividade antioxidante das amostras analisadas. As atividades antioxidantes dos extratos de manjerona e de pólen analisados pelo método do β -caroteno foram de 82,41% e 91,93%, respectivamente. Neste método o EEP mostrou percentual superior ao EEM. Verifica-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras.

Tabela 12 - Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

Amostras	Atividade antioxidante (%)*
Manjerona **	82,41 ^b \pm 0,16
Pólen apícola***	91,93 ^a \pm 0,22
α -tocoferol****	70,29 ^c \pm 0,17
BHA****	68,06 ^d \pm 0,22
BHT****	63,68 ^e \pm 0,18

*Valores das médias das triplicatas \pm desvio padrão. Médias seguidas de letra diferente na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ** 5 mg/mL; *** 10 mg/mL; **** 100 μ g/mL.

Carpes et al. (2008) ao avaliar a atividade antioxidante pelo método β -caroteno de 36 amostras de pólen apícola da região Sul do Brasil, obtiveram em seus EEP uma média de $83,60 \pm 6,56\%$ na concentração 6,66 mg/mL, e suas amostras oriundas de União da Vitória-PR não ultrapassaram 90% nesta mesma concentração.

Ao analisarem as propriedades antioxidantes pelo método β -caroteno de manjerona adquirida em Pato Branco, Silva et al. (2012) encontraram um percentual de 54,61% no EEM (0,89 mg/mL), sendo este inferior ao percentual encontrado no presente trabalho.

Trabalhos disponíveis na literatura sobre atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico, envolvendo essas matrizes, pólen e manjerona, são escassos.

Os antioxidantes comerciais α -tocoferol, BHA e BHT foram utilizados como controles positivos. As atividades antioxidantes pelo sistema de clareamento do β -caroteno/ácido linoleico para os antioxidantes comerciais BHT, BHA e α -tocoferol podem ser observadas na Tabela 12. Entre os controles positivos testados, o que obteve maior percentual de atividade antioxidante foi o α -tocoferol.

Quando se compara os percentuais obtidos neste estudo com os dos padrões, observa-se que os extratos apresentaram-se superiores a eles. Entretanto, os padrões foram avaliados numa concentração mais baixa que os extratos, indicando desta forma, maior %AA nestas substâncias que são puras.

A atividade antioxidante por este método pode ser útil especialmente na investigação de antioxidantes lipofílicos, como os óleos essenciais. Por outro lado,

se compostos polares forem testados apenas pelo método do β -caroteno pode-se correr o risco de subestimar a atividade antioxidante desses compostos. Dessa forma, é necessário o uso de outros métodos, como o DPPH^{*}, ABTS^{**} e FRAP que independem da polaridade do substrato (TIVERON, 2010).

Em função das diferenças de especificidade e sensibilidade entre os métodos não foi possível usar quantidades iguais de antioxidantes em cada teste. Por outro lado, o uso de concentrações distintas entre os métodos torna difícil a comparação dos resultados. Entretanto, é válido supor que independente do método escolhido, a medida da atividade antioxidante em várias concentrações fornece uma compreensão melhor do potencial dos compostos presentes, neste estudo, o uso de diferentes métodos confirmou a atividade antioxidante dos compostos presentes nas amostras.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS HAMBÚRGUERES

5.5.1 Composição centesimal

Os resultados da composição centesimal dos hambúrgueres podem ser visualizados na Tabela 13.

Tabela 13 - Composição centesimal dos diferentes tratamentos de hambúrguer

Análises (%)	Tratamentos				Legislação*
	T1	T2	T3	T4	
Umidade	68,80 ^{ab} ± 0,61 ^{**}	68,58 ^b ± 0,40	69,08 ^{ab} ± 0,33	69,79 ^a ± 0,35	-
Cinzas	2,44 ^c ± 0,02	2,62 ^a ± 0,05	2,52 ^{bc} ± 0,03	2,54 ^{ab} ± 0,01	-
Proteína total	14,61 ^a ± 0,54	15,84 ^a ± 0,68	15,95 ^a ± 1,11	15,70 ^a ± 0,18	Mín. 15%
Lipídeos	7,72 ^a ± 1,00	7,32 ^a ± 0,22	7,47 ^a ± 0,21	6,94 ^a ± 0,31	Máx. 23%
Carboidratos	6,43 ^a ± 1,06	5,65 ^a ± 1,20	4,97 ^a ± 1,02	5,03 ^a ± 0,35	3%

*Legislação brasileira, BRASIL (2000). **Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. T1: controle; T2: 0,01% BHT; T3: 0,3% manjerona; T4: 0,3% pólen apícola.

Conforme Tabela 13 pode-se observar diferença significativa ($p < 0,05$) nos percentuais de umidade e cinzas. Em contrapartida os teores de proteína, gordura e carboidratos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos, ou seja, as aplicações dos extratos de manjerona e pólen apícola e do antioxidante sintético BHT não influenciaram estes parâmetros.

Os valores obtidos foram comparados com as exigências da legislação brasileira (BRASIL, 2000), com o intuito de verificar se os tratamentos de hambúrguer produzidos enquadraram-se nas normas vigentes.

Como pode ser visualizado na Tabela 13, o teor de proteína do tratamento controle foi um pouco inferior ao limite estabelecido na legislação brasileira, porém, estatisticamente não gerou diferença ($p > 0,05$) dos demais tratamentos. Portanto, com exceção do conteúdo de carboidratos, os demais parâmetros estão de acordo com o Padrão de Identidade e Qualidade do produto (BRASIL, 2000). A legislação brasileira, não estabelece parâmetros para umidade e cinzas em amostras de hambúrguer.

Em relação à umidade e gordura, Teixeira (2012) ao avaliar o efeito da adição de farinha de folhas de *Moringa oleifera* como antioxidante natural em hambúrguer de carne bovina, encontrou para umidade e gordura valores aproximados ao deste estudo (66,91 – 68,62% e 6,64 – 7,30%, respectivamente). Ferreira et al. (2012) também obtiveram valores de umidade (68,3 - 70,9%) próximos ao deste estudo. Porém, Sousa et al. (2012) encontraram teor de umidade superior (72,31%), enquanto Mohamed e Mansour (2012) valores para umidade inferiores (59,17%) e gordura superiores (19,35%) ao desta pesquisa.

Para teor de proteína obteve-se valores entre 14,61 e 15,95% nos diferentes tratamentos (Tabela 13). Outros trabalhos relataram os valores de 18,55% (MOHAMED; MANSOUR, 2012), 21,60% (SOUSA et al., 2012) e 14,62% (BORBA et al., 2013).

Com relação às cinzas, neste estudo foram encontrados, em média, 2,53%. Os valores obtidos por outros autores foram: 0,87% (ALESON-CARBONELL et al., 2005), 0,63% (TEIXEIRA, 2012), 1,43% (MOHAMED; MANSOUR, 2012) e 3,50% (SOUSA et al., 2012). Em parte, a variação nos teores de cinzas está relacionada com as variações no teor de umidade das amostras. A quantidade de sal utilizada

nas formulações dos hambúrgueres também pode contribuir para a elevação da quantidade de cinzas no produto.

Para o teor de carboidratos, nesta pesquisa foi encontrada a média de 5,52%, estando próximo ao teor observado por Huber (2012), que encontrou 4,67%. No entanto, esse valor ficou acima quando comparado ao observado por Leonardi et al. (2009) de 1,78% e por Teixeira (2012) de 1,16%. Essa diferença pode ter sido influenciada pela proporção dos demais nutrientes presentes nos hambúrgueres, já que todos os valores de carboidratos citados foram estimados por diferença.

As divergências entre os valores encontrados neste trabalho frente aos de outros pesquisadores, podem ser fundamentadas por vários fatores que podem influenciar a composição físico-química do hambúrguer, mesmo que a matéria-prima dos estudos seja da mesma espécie, pois a composição química da carne bovina é diretamente afetada pela genética, nutrição e idade do animal. Além disso, a forma de preparo e processamento ou adição dos ingredientes, muitas vezes são diferentes, o que também pode interferir nos valores da composição centesimal.

5.5.2 Determinação da oxidação lipídica

5.5.2.1 Índice de peróxido (IP)

O valor de peróxido é um indicador sensível para a fase inicial de oxidação e a sua presença é uma indicação de que a deterioração do sabor e do cheiro, como um resultado da instabilidade lipídica, está prestes a acontecer (ZAMBIAZI, 1999). O índice de peróxido é um método largamente utilizado para determinar os estágios iniciais de oxidação lipídica em produtos cárneos.

Esse método foi utilizado nesse trabalho para todos os tratamentos, o resultado foi o mesmo em todos os dias de análise e igual a zero (0,0 mEq/Kg). Pereira (2009) ao avaliar carne mecanicamente separada de ave encontrou zero mEq/kg, em todas as formulações adicionadas com extratos de chá verde, erva mate, marcela, própolis, BHA e controle. Em estudo realizado por Racanicci et al.

(2000), avaliou-se o efeito da adição do antioxidante BHT e do armazenamento sobre a qualidade da farinha de carne e ossos. Nos tratamentos em que o antioxidante foi adicionado no tempo zero e com sete dias de armazenamento, o índice de peróxidos manteve-se zero até o final do experimento (70 dias). Esses resultados estão de acordo com o presente estudo, no qual não houve variação ao longo do período de estocagem.

Georgantelis et al. (2007) ao avaliar o efeito do extrato de alecrim, quitosana e α -tocoferol durante o armazenamento de hambúrgueres de carne bovina, relataram que os melhores efeitos antioxidantes foram obtidos com a combinação de quitosana e extrato de alecrim, que obtiveram valores de peróxidos de 0,26 à 0,74 mEq/kg, aos 30 e 180 dias de armazenamento, respectivamente. Sendo esses resultados superiores ao encontrado nesta pesquisa e pelos outros autores. Entretanto, limites para índice de peróxidos em amostras de hambúrgueres não estão previstos pela legislação brasileira.

Dessa forma, os bons resultados obtidos para as amostras do presente estudo, indicaram que estas estavam bem conservadas e sem nenhum fator aparente que demonstrasse algum tipo de deterioração, ou seja, de rancidez oxidativa. Alguns fatores podem ter contribuído para este bom resultado, como o fato dos extratos adicionados, que poderiam retardar ainda mais o processo de peroxidação lipídica, já que os produtos foram embalados a vácuo, o que dificulta o acesso do oxigênio atmosférico, que é um dos principais agentes oxidantes de lipídios (ARAÚJO, 2008). Mas também pela qualidade inicial da matéria-prima e ingredientes, pelo baixo teor de lipídeos das amostras e pelas excelentes condições de embalagem e temperatura de estocagem.

5.5.2.2 Índice de TBARS

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

Particularmente para carnes e derivados, a informação do número de TBARS é bastante relevante devido aos processos envolvidos na elaboração de

produtos cárneos que favorecem a formação do malonaldeído, sendo fundamental o emprego do teste na avaliação da qualidade do produto final (OSAWA; FELICIO; GONÇALVES, 2005). Os resultados obtidos para TBARS estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores médios de TBARS nos diferentes tratamentos de hambúrguer durante o período de armazenamento

Tempo de armazenamento (dias)	TBARS (mg malonaldeído/kg amostra)			
	Tratamentos			
	T1*	T2	T3	T4
0	^E 1,116 ± 0,039 ^b	^E 1,100 ± 0,008 ^b	^F 0,683 ± 0,039 ^a	^C 1,123 ± 0,023 ^b
7	^E 1,135 ± 0,031 ^b	^D 1,202 ± 0,020 ^c	^{EF} 0,754 ± 0,026 ^a	^C 1,147 ± 0,013 ^{bc}
14	^C 1,612 ± 0,034 ^c	^C 1,552 ± 0,034 ^c	^A 1,043 ± 0,043 ^a	^B 1,323 ± 0,034 ^b
21	^D 1,270 ± 0,016 ^c	^D 1,237 ± 0,042 ^c	^{DE} 0,815 ± 0,016 ^a	^D 1,021 ± 0,019 ^b
28	^D 1,351 ± 0,048 ^c	^C 1,561 ± 0,016 ^d	^{CD} 0,842 ± 0,010 ^a	^C 1,194 ± 0,025 ^b
35	^B 1,756 ± 0,016 ^c	^B 1,713 ± 0,034 ^c	^{BC} 0,912 ± 0,016 ^a	^A 1,535 ± 0,025 ^b
42	^A 2,358 ± 0,029 ^c	^A 2,297 ± 0,040 ^c	^B 0,950 ± 0,024 ^a	^A 1,610 ± 0,043 ^b

*Valores apresentados como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. T1: controle; T2: 0,01% BHT; T3: 0,3% manjerona; T4: 0,3% pólen apícola.

Os resultados apresentados na Tabela 14 demonstram que, no dia do processamento (tempo zero) apenas o T3 (0,3% de manjerona) diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos. Enquanto aos sete dias de armazenamento congelado, os tratamentos T1 (controle), T2 (0,01% de BHT - padrão) e T3 diferiram estatisticamente entre si, no entanto, o T4 (0,3% de pólen apícola) não diferiu significativamente ($p > 0,05$) do controle e padrão. Aos 14, 21, 35 e 42 dias de armazenamento, os tratamentos controle e padrão não mostraram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si. Entretanto, no 28º dia de estocagem todos os tratamentos diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si.

Em estudo realizado por Trindade, Mancini-Filho e Villavicencio (2010) avaliou-se a oxidação lipídica de hambúrgueres de carne bovina produzidos com antioxidante natural oriundo de alecrim e orégano, encontraram valores de TBARS

no tempo zero, para o tratamento controle e com extrato de orégano superiores (cerca de 2 mg MDA/kg) ao deste trabalho no dia do processamento. Ferreira et al. (2011) ao adicionar extrato etanólico de erva-mate como antioxidante natural em hambúrguer de carne bovina, notaram que a adição de 0,01% de erva-mate mostrou ineficiente em restringir a peroxidação lipídica, com TBARS de 0,5 a 15 mg MDA/kg, sendo estes valores superiores ao desta pesquisa. Enquanto a adição de 0,1% resultou em atividade antioxidante eficiente, com TBARS de 0,5 a 0,8 mg MDA/kg, para os tratamentos adicionados de erva-mate.

Forell et al. (2010) estudaram o efeito do tipo de emulsionantes e antioxidantes sobre a estabilidade oxidativa de hambúrgueres de carne bovina, e observaram que as proteínas do soro de leite, utilizadas como emulsionantes, protegeram os hambúrgueres de carne bovina contra a oxidação lipídica, mantendo níveis de TBARS de todas as formulações abaixo de 0,6 mg MDA/kg após 6 meses de armazenamento congelado. Brum et al. (2011) ao aplicar ácido fólico em hambúrguer de carne bovina, obtiveram valores de TBARS entre o tempo zero e 45 dias, de 0,2 à 0,5 mg MDA/Kg, respectivamente. Sendo esses resultados inferiores ao encontrado nesta pesquisa.

A oxidação lipídica apresentou-se de forma crescente com a evolução do tempo em todas as amostras. Da mesma forma que Stika et al. (2007) observaram um acréscimo nos valores de TBARS da carne bovina com o aumento do tempo de estocagem sob congelamento a -29 °C. Resultados semelhantes foram relatados por Selani et al. (2011) que verificaram um aumento nos valores de TBARS de carne de frango durante armazenamento congelado. Processos de oxidação são atenuados durante o armazenamento congelado, mas não completamente evitados; alguns radicais solúveis em lipídios podem ser ainda mais estáveis a temperaturas mais baixas e, assim, propagar a oxidação (FORELL et al., 2010).

De acordo com a Tabela 14, o índice de TBARS atingiu o ponto máximo ou pico de oxidação aos 14 dias e depois apresentou um decréscimo aos 21 dias, fato que demonstra que estes produtos da oxidação são produtos pouco estáveis ao longo da estocagem. Mathias et al. (2010) também observaram em suas amostras de presunto de peru, um ponto máximo aos 30 dias com posterior declínio nos valores de TBARS. A redução da quantidade destes produtos de oxidação pode ser atribuída à degradação destes produtos em outros subprodutos, tais como, álcoois e ácidos orgânicos, ou até mesmo a interação com as proteínas da carne, formando

compostos estáveis e também com o glicogênio muscular atuando como interferentes no teste (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; OSAWA; FELICIO; GONÇALVES, 2005).

Os níveis de TBARS no 42º dia de armazenamento foram significativamente maiores ($p < 0,05$) no controle e no padrão (2,358 e 2,297 mg MDA/Kg, respectivamente), do que nos hambúrgueres adicionados de extrato de manjerona e pólen apícola com valores de 0,950 e 1,610 mg MDA/Kg, respectivamente (Tabela 14).

Os resultados demonstram que o tratamento com extrato de manjerona apresentou valores de TBARS significativamente inferiores aos demais tratamentos durante todo o período, evidenciando maior proteção oxidativa. Com isso, observa-se que a aplicação do EEM proporcionou melhores resultados em relação à estabilidade oxidativa do hambúrguer de carne bovina, apresentando níveis significativamente menores de oxidação quando comparada aos outros tratamentos. Verifica-se ainda que, a adição de 0,3% de extrato de manjerona inibiu 60% da oxidação lipídica quando comparada com a formulação controle, aos 42 dias de armazenamento congelado.

O que confirma esse alto potencial antioxidante da manjerona é o estudo realizado por Mohamed; Mansour e Farag (2011) sobre a estabilidade lipídica de carne bovina moída irradiada, que verificaram valores de TBARS de amostras tratadas com manjerona menores do que os valores das amostras com alecrim e sálvia durante o armazenamento. Resultado semelhante foi observado por Mohamed e Mansour (2012), que avaliaram a estabilidade lipídica de hambúrguer de carne bovina com adição de óleo essencial de manjerona e verificaram valores de TBARS significativamente menores que a formulação com BHT, durante o armazenamento congelado por três meses.

Embora no presente estudo, a amostra formulada com extrato de pólen apícola foi mais suscetível à oxidação lipídica do que o tratamento com manjerona verifica-se que houve 32% de inibição da oxidação lipídica com a adição de 0,3% de pólen apícola, em comparação com a formulação controle durante o armazenamento congelado por 42 dias, e a taxa de formação de TBARS foi inferior quando comparado com as amostras controle e padrão, demonstrando sua eficiência antioxidante. O que corrobora com o observado por Dalla Santa (2008), que

encontrou uma redução no valor de TBARS em salame adicionado de extrato de pólen apícola durante o armazenamento.

Dessa forma, a concentração utilizada de antioxidantes naturais neste estudo, foi suficiente para manter a estabilidade oxidativa do produto durante o tempo de armazenamento congelado. O mecanismo de efeito protetor da oxidação lipídica, dos extratos de manjerona e pólen apícola pode ser devido à presença de compostos fenólicos, que tem a capacidade de funcionar como inibidores de radicais livres, como quelantes de metais ou sequestrantes do oxigênio singleto e como agentes redutores (POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2005).

A legislação brasileira não apresenta limite máximo para malonaldeído/kg em produtos cárneos. Valores de TBARS até 1,59 mg de MDA/kg de amostra são considerados baixos para serem percebidos por análise sensorial e não causam danos a saúde do consumidor (TORRES; OKANI, 1997). De acordo com Al-Kahtani; Abu-Tarboush e Bajaber (1996), o produto cárneo pode ser considerado em bom estado, se apresentar valores abaixo de 3 mg de malonaldeído/kg de amostra.

Sendo assim, as amostras de hambúrguer ainda permaneceram em estado satisfatório aos 42 dias de armazenamento congelado. A embalagem a vácuo e a temperatura de estocagem são fatores que proporcionaram proteção adicional aos produtos contra o desenvolvimento da oxidação lipídica.

5.5.3 Avaliação microbiológica

A análise microbiológica do produto cru foi realizada após processamento, com o intuito de verificar se os tratamentos de hambúrguer produzidos enquadravam-se na legislação vigente RDC nº 12/2001 (BRASIL, 2001). E com a finalidade de atestar a segurança das amostras para realização da análise sensorial.

Os resultados obtidos para contagem de Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Clostridium* sulfito redutor e *Salmonella* spp. encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15 - Caracterização microbiológica dos diferentes tratamentos de hambúrguer

Análises	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Coliformes a 35 °C (UFC/g)*	$3,1 \times 10^2$	< 10	$1,4 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$
Coliformes a 45 °C (UFC/g)	< 10	< 10	< 10	< 10
Estafilococos coag. (+) (UFC/g)	< 10^2	< 10^2	< 10^2	< 10^2
<i>Clostridium</i> sulfito redutor (UFC/g)	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Samonella</i> spp. (25g)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

*UFC/g= Unidade Formadora de Colônias por grama. T1: controle; T2: 0,01% BHT; T3: 0,3% manjerona; T4: 0,3% pólen apícola.

Todas as amostras apresentaram-se em condições sanitárias satisfatórias de acordo com a legislação brasileira RDC nº 12, de 12 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), que estabelece para produtos cárneos crus, refrigerados ou congelados (hambúrgueres, almôndegas, quibe e similares) o limite de 5×10^3 UFC/g de coliformes a 45 °C, 5×10^3 UFC/g de Estafilococos coagulase positiva, 3×10^3 UFC/g de *Clostridium* sulfito redutor e ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de carne.

Lima, Bruno e Souza Neto (2011), verificaram a estabilidade microbiológica de hambúrgueres de caju e também encontraram o produto dentro dos parâmetros microbiológicos exigidos pela legislação brasileira. Da mesma forma que Meneses, Molina e Vargas (2011), obtiveram todos os tratamentos de hambúrguer com adição de banana verde, em conformidade com os requisitos microbiológicos exigidos pela Norma Técnica Colombiana e pela legislação brasileira.

Teixeira (2012) encontrou resultados semelhantes ao do presente estudo para Estafilococos e *Salmonella* spp. Na pesquisa realizada por Batista et al. (2011), das 12 amostras de hambúrgueres de carne bovina cruas analisadas, dez apresentaram contaminação por coliformes termotolerantes, duas estavam contaminadas por *Staphylococcus* coagulase positiva e em nenhuma das amostras analisadas foi confirmada a presença de *Salmonella* spp. ou Clostrídios sulfito redutores. Entretanto, Fortuna; Nascimento e Franco (2013) das 80 amostras de hambúrgueres analisadas, 22 estavam contaminados por *Salmonella* spp.

Foi observada a presença de coliformes a 35 °C nas amostras, com variação entre <10 e $1,4 \times 10^3$ UFC/g (Tabela 15). A legislação brasileira não indica limites de tolerância para coliformes a 35 °C em produtos cárneos crus, refrigerados ou

congelados. Porém, tem sido observado que a contagem bacteriana acima de $1,0 \times 10^5$ UFC/g em carne moída fresca compromete o produto em relação à sua qualidade higiênico-sanitária (Silva et al., 2007). A presença desse grupo de microorganismos pode indicar a necessidade de controle mais rígido relacionado à higiene na elaboração e comercialização do produto (MELO et al., 2012).

Os resultados demonstraram qualidade microbiológica satisfatória, confirmando as boas condições higiênico-sanitárias nas etapas do processamento, cuidado nas operações de limpeza e sanitização dos utensílios e equipamentos e da higiene dos manipuladores.

5.5.4 Análise sensorial

No processo de desenvolvimento ou inovação de produtos, os estudos envolvendo a preferência de consumidores são de extrema importância e constituem a base necessária para a conquista de novos mercados (GUERRERO, 1999). Recentemente, a análise sensorial tem alcançado uma ampla difusão, principalmente quando se considera a crescente preocupação para atender as preferências dos consumidores.

A aceitação de um alimento é basicamente o resultado da interação entre o alimento e o consumidor em um dado momento. Os testes de aceitação requerem um grande número de participantes que representem a população de consumidores potenciais dos produtos (BARRIOS; COSTELL, 2004).

A análise sensorial do presente estudo foi conduzida com o intuito de verificar a aceitação dos consumidores frente às características gerais dos hambúrgueres. O *panel* de provadores foi integrado por 112 julgadores com idade média de 22 anos, sendo composta por 57 mulheres e 55 homens, não treinados. Do total dos provadores apenas dois responderam não gostar de hambúrguer.

Entre os testes de aceitação aplicados no presente estudo, tem-se a escala do ideal. A escala do ideal é um método afetivo quantitativo, que possibilita identificar uma resposta específica aos atributos sensoriais de um produto e a intensidade considerada como ideal (FERREIRA, 2000).

O teste do ideal para o atributo cor foi utilizado para identificar as formulações elaboradas com características mais próximas dos hambúrgueres comercializados por marcas conhecidas e vendidos em supermercados. Observou-se que mais pessoas consideraram os produtos como ideal (Figura 18), sendo que o tratamento controle apresentou-se ideal para quase 70% das respostas, valor considerado como ideal por Ferreira (2000).

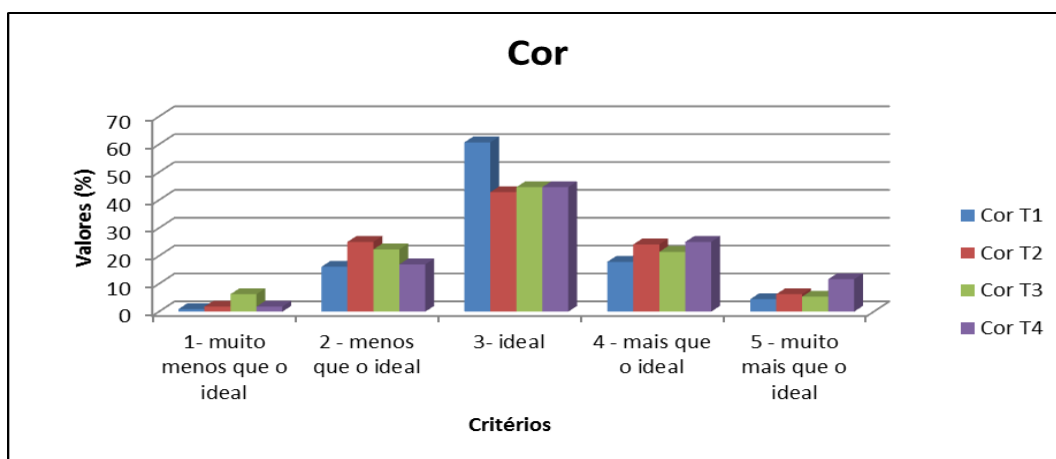


Figura 18 - Histogramas dos valores obtidos para cor na escala do ideal na avaliação das amostras de hambúrguer

T1: controle; T2: 0,01% BHT; T3: 0,3% manjerona; T4: 0,3% pólen apícola.

Na Figura 19, para avaliação do odor, T2 e T4 estão mais próximas do ideal. Segundo Ciriano et al. (2009) os extratos vegetais tem a possibilidade de conter substâncias que podem conferir odor e/ou sabor especial ao produto final, como pode ser observado.

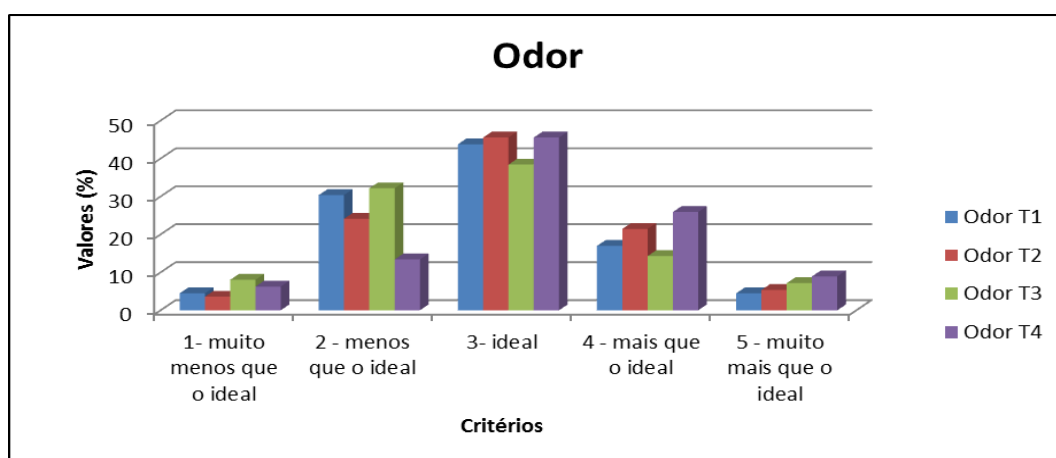


Figura 19 - Histogramas dos valores obtidos para odor na escala do ideal na avaliação das amostras de hambúrguer

T1: controle; T2: 0,01% BHT; T3: 0,3% manjerona; T4: 0,3% pólen apícola.

A aparência da carne é uma das primeiras características observadas pelos consumidores (FANATICO et al., 2005). A avaliação da aparência foi realizada para identificar a influência da adição de antioxidantes neste parâmetro. Observa-se que a avaliação de ideal na aparência foi reduzida com a adição de antioxidantes naturais. O tratamento controle apresentou-se mais próximo do ideal (Figura 20).

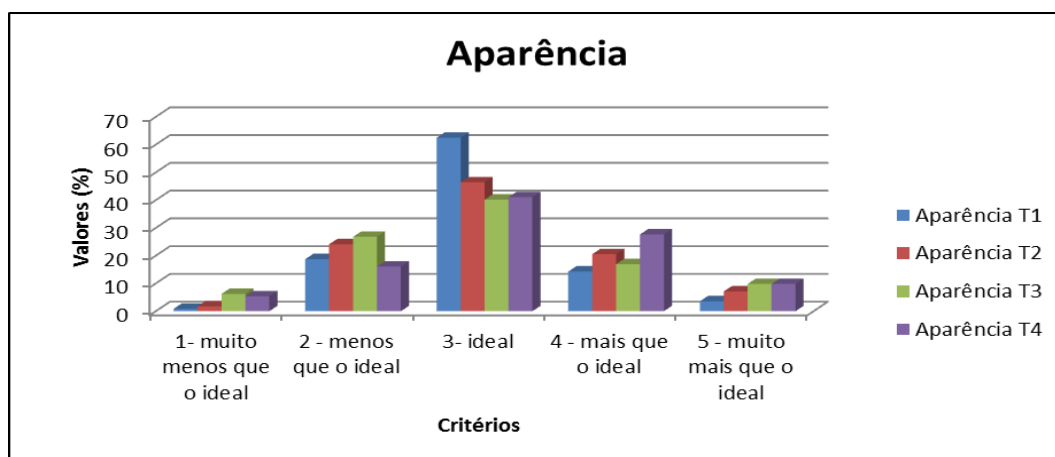


Figura 20 - Histogramas dos valores obtidos para aparência na escala do ideal na avaliação das amostras de hambúrguer

T1: controle; T2: 0,01% BHT; T3: 0,3% manjerona; T4: 0,3% pólen apícola.

Na Figura 21, para avaliação do sabor, T1 e T4 estão mais próximas do ideal e observa-se também que, para este atributo, a formulação adicionada de manjerona foi identificada como diferente, ou seja, recebeu a denominação de menos sabor que o ideal por mais provadores que as demais amostras avaliadas. Esta menor aceitação da amostra com extrato de manjerona, em parte se deve ao forte gosto residual da especiaria, a qual não agrada a todas as pessoas e nem tem seu sabor associado ao produto.

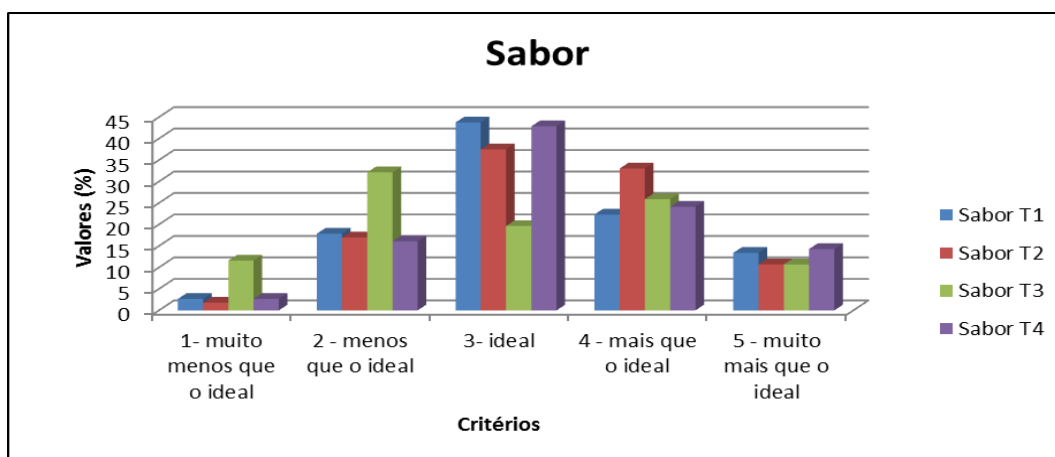


Figura 21 - Histogramas dos valores obtidos para sabor na escala do ideal na avaliação das amostras de hambúrguer

T1: controle; T2: 0,01% BHT; T3: 0,3% manjerona; T4: 0,3% pólen apícola.

Os resultados obtidos com a análise sensorial para os atributos cor, odor, aparência e sabor (escala do ideal) e para a avaliação global (escala hedônica) são apresentados na Tabela 16.

Para o atributo cor, não houve diferença significativa ($p>0,05$) das formulações com o T1 - controle. O Tratamento 4, elaborado com 0,3% de pólen apícola, apresentou o melhor resultado e diferiu significativamente ($p<0,05$) dos Tratamentos 2 e 3, elaborados com 0,01% de BHT (padrão) e 0,3% de manjerona, respectivamente.

De acordo com o apresentado na Tabela 16, foi observado que o Tratamento controle apresentou-se significativamente diferente ($p<0,05$) do T4, e não mostrou diferença significativa ($p>0,05$) dos demais tratamentos para o atributo odor. O Tratamento 4 apresentou alta pontuação, entre odor ideal e mais que o ideal, e não diferiu do T2 – padrão.

Para o atributo aparência, não houve diferença significativa ($p>0,05$) das formulações com o controle. A formulação T4 apresentou a maior pontuação e diferiu estatisticamente ($p<0,05$) do Tratamento 3, que apresentou a menor pontuação.

Quanto ao atributo sabor, a formulação contendo manjerona (T3) apresentou a menor pontuação (menos que o ideal) e diferiu significativamente ($p<0,05$) dos demais tratamentos.

O método de escala hedônica busca avaliar a aceitação do provador pelo produto, seguindo uma escala previamente estabelecida a qual varia gradativamente. Na avaliação global do produto por meio de escala hedônica, o Tratamento 3 adicionado de manjerona apresentou resultado inferior e diferiu significativamente ($p<0,05$) dos demais tratamentos (Tabela 16).

De forma geral, as notas para a avaliação global, dadas pelos provadores aos hambúrgueres foram baixas, isso é explicado pela utilização de provadores não treinados para simular a atitude do consumidor frente ao produto. Porém deve ser levado em consideração que o produto em questão, hambúrguer bovino, muito raramente é consumido sozinho, seu consumo comumente está acompanhado de pão, queijo, salada, molhos e condimentos que alteram e melhoram o sabor do produto (CHIRINOS et al., 2002). Neste estudo, o produto foi servido aos julgadores

sem os acompanhamentos para que não houvesse interferência no gosto apresentado pelas amostras, o que foge do hábito comum de consumo.

Embora, as notas obtidas na avaliação global tenham sido baixas, os valores encontrados ainda podem ser considerados satisfatórios, pois notas entre 6 e 9 (gostei ligeiramente a gostei muito) sugerem que o produto poderá ser aceito no mercado sob o ponto de vista sensorial (ANZALDÚA-MORALEZ, 1994). Assim, os hambúrgueres controle, padrão e com adição de pólen apícola obtiveram valores médios de 6,68, demonstrando que estes seriam aceitos por consumidores sob o ponto de vista sensorial.

Tabela 16 - Médias das notas obtidas na avaliação sensorial dos hambúrgueres através das escalas do ideal e hedônica

Escala do Ideal	Tratamentos			
	T1*	T2	T3	T4
Cor	3,08929 ^{ab} ± 0,74	3,08036 ^b ± 0,90	2,97321 ^b ± 0,95	3,27679 ^a ± 0,94
Odor	2,86607 ^{bc} ± 0,91	3,00893 ^{ab} ± 0,91	2,80357 ^c ± 1,02	3,17857 ^a ± 0,99
Aparência	3,00893 ^{ab} ± 0,72	3,07143 ^{ab} ± 0,90	2,97321 ^b ± 1,04	3,20536 ^a ± 1,00
Sabor	3,25893 ^a ± 0,99	3,33929 ^a ± 0,94	2,91964 ^b ± 1,22	3,31250 ^a ± 1,00
Escala Hedônica				
Avaliação Global	6,78571 ^a ± 1,75	6,49107 ^a ± 1,77	5,89286 ^b ± 2.18	6,76786 ^a ± 1,77

*Valores das médias ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste T. T1: controle; T2: 0,01% BHT; T3: 0,3% manjerona; T4: 0,3% pólen apícola.

Lima (2008) desenvolveu hambúrguer vegetal elaborado à base de caju, e obteve valores de aceitação sensorial (próximos a nota 6,0 – gostei ligeiramente) semelhantes aos hambúrgueres elaborados no presente estudo. Enquanto Ferreira et al. (2011), obtiveram nota média de 7,2 para a avaliação global dos hambúrgueres de carne bovina adicionados de extrato etanólico de erva-mate (verde ou torrada) e com BHT, sendo superior as notas obtidas no presente trabalho.

No entanto, notas médias inferiores foram relatadas por Trindade et al. (2009): 5,74 para aceitação geral de hambúrgueres de carne bovina adicionados de BHT/BHA, extratos de orégano e alecrim irradiadas ou não. García; Calvo e Selgas (2009) obtiveram valor médio de 5,5 para aceitabilidade global de hambúrguer

bovino, que foi maior para o controle do que para amostras contendo tomate seco com pele. E média ainda mais baixa, no estudo de Kassem; Atta-Alla e Ali (2011): 4 para aceitação geral de hambúrgueres de bovinos adicionados de óleo essencial de tomilho e jojoba.

Os resultados referentes ao índice de aceitabilidade para a avaliação global de cada tratamento estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Índice de Aceitabilidade (IA) em percentual para a avaliação global de cada tratamento

Atributo	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Avaliação Global	75,39%	72,12%	65,48%	75,20%

T1: controle; T2: 0,01% BHT; T3: 0,3% manjerona; T4: 0,3% pólen apícola.

A aceitabilidade do consumidor para produtos cárneos é intrinsecamente relacionada com seus atributos de cor, odor, aparência, sabor e suculência (VENTURINI et al., 2011). Quanto ao índice de aceitabilidade dos produtos avaliados sensorialmente, pôde-se observar que o tratamento com 0,3% de extrato de manjerona apresentou menor índice de aceitação na avaliação global do produto. O tratamento controle com 75,39% apresentou maior aceitação para o atributo avaliação global.

Dessa forma, os tratamentos controle, com adição de pólen apícola e padrão apresentaram índices de aceitabilidade superiores a 70% para a avaliação global. Segundo Dutcosky (2007) a repercussão é favorável quando o índice de aceitabilidade for maior ou igual 70%, sendo assim pode-se afirmar que a aplicação do extrato de pólen apícola não interferiu na aceitabilidade dos atributos avaliados. Entretanto, a aplicação do extrato de manjerona interferiu negativamente na aceitabilidade dos atributos avaliados. Su et al. (2013) em hambúrgueres de carne bovina com okara, alcançaram bom índice de aceitação para a suculência, aparência e aceitação geral com IA de 71 a 81%.

O coeficiente de concordância foi aplicado para verificar e avaliar a concordância entre julgadores na análise sensorial. Na Tabela 18, estão

apresentados os coeficientes de concordância, para as propriedades cor, odor, aparência, sabor e avaliação global das amostras.

Tabela 18 - Coeficiente de Concordância (CC) em percentual para as propriedades sensoriais de cada amostra

Atributos	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Cor	53,43%	36,83%	35,68%	36,12%
Odor	38,13%	38,00%	32,15%	36,09%
Aparência	55,63%	38,94%	30,72%	32,33%
Sabor	33,87%	33,61%	19,58%	33,31%
Avaliação Global	28,22%	27,12%	16,89%	28,98%

T1: controle; T2: 0,01% BHT; T3: 0,3% manjerona; T4: 0,3% pólen apícola.

Na Tabela 18 se verificam as concordâncias das notas dos julgadores para análise sensorial dos hambúrgueres; pode-se observar, para o atributo cor, que o tratamento com maior concordância foi o hambúrguer controle, com coeficiente de concordância de 53,43%.

Para os atributos sensoriais odor, aparência e sabor, o tratamento com maiores percentuais foi o Controle com CC de 38,13%, 55,63% e 33,87%, respectivamente.

Quando se avaliou o parâmetro sensorial avaliação global, o maior índice de concordância foi de 28,98% concedido para a formulação de hambúrguer com adição de 0,3% de pólen apícola.

Pode-se observar que a menor concordância entre os provadores ocorreu no julgamento do atributo avaliação global, pois apresentou os menores percentuais. Observa-se também que os julgadores se mostraram menos concordantes para o Tratamento 3 (0,3% de manjerona), pois para os cinco atributos, os valores do CC foram menores para este tratamento (Tabela 18). Pode-se dever ao fato de haverem pessoas no grupo de provadores que gostam de manjerona e outras que não gostam o que leva a ocasionar essa redução na concordância das notas atribuídas ao produto.

Outra forma com que os dados da escala hedônica têm sido avaliados é pelo mapa de preferência. O mapa de preferência interno é construído apenas com

dados de preferência e é baseado no modelo de componentes principais (CP), em que os dados são arranjados em uma matriz, consistindo de amostras (objetos) e consumidores (variáveis) (HELGESEN; SOLHEIM; NAES, 1997).

Com os dados obtidos no teste de aceitação pela avaliação global das quatro amostras de hambúrgueres, foi realizada a análise do mapa de preferência interno (Figura 22). O primeiro CP explicou 39,81% e o segundo, 23,44%. Os dois primeiros CP explicam a maior parte de variância (63,25%) entre as amostras quanto à sua aceitação. Assim, apenas os dois primeiros CP são suficientes para discriminar as amostras quanto à aceitação. O mapa de preferência interno das amostras foi construído de forma a considerar as preferências individuais de cada provador. Os losangos cinza caracterizam a aceitação individual de cada provador e vermelho a aceitação de cada amostra (Figura 22).

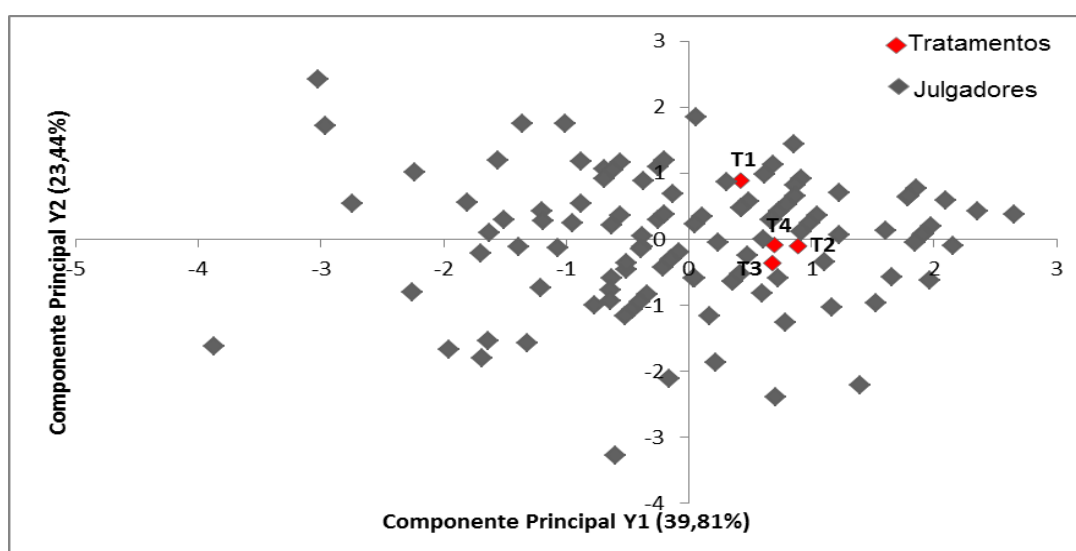


Figura 22 - Dispersão dos tratamentos de hambúrgueres em relação à aceitação de cada julgador para a avaliação global

T1: controle; T2: 0,01% BHT; T3: 0,3% manjerona; T4: 0,3% pólen apícola.

A separação espacial das amostras de hambúrguer sugere a existência de dois grupos de acordo com a aceitação das mesmas, sendo um grupo formado pela amostra controle e o outro pelas amostras padrão e com adição de pólen apícola e manjerona. Assim, percebe-se pela leitura do gráfico que a presença dos antioxidantes no hambúrguer alterou as características do produto, formando um grupo distinto do controle.

O tratamento controle está no lado direito superior positivo, aonde se apresenta maior concentração de provadores, ou seja, estes provadores atribuíram

notas maiores para esta formulação. Em geral, pode-se observar menor tendência de aceitação pelo Tratamento 3 e maior aceitação pela formulação controle (Figura 22). Esses resultados corroboram com os resultados do teste de aceitação e coeficiente de concordância.

Para verificar a preferência entre as amostras aplicou-se o teste de ordenação, e com a soma dos valores atribuídos pelos julgadores obtiveram-se os dados da Tabela 19.

Tabela 19 - Módulos das diferenças entre os pares da soma total da ordenação da preferência

	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Soma de ordens	249 ^b	278 ^{ab}	324 ^a	269 ^b
Diferença vs. T1		29	75	20
T2			46	9
T3				55

Pares de soma de ordens seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si (quanto à preferência), pelo teste de Friedman, a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). T1: controle; T2: 0,01% BHT; T3: 0,3% manjerona; T4: 0,3% pólen apícola.

As somas das ordens das formulações de hambúrguer foram comparadas com o valor crítico de diferença de soma de ordens (diferença mínima significativa) para estabelecer preferência significativa a 5% e 1% de probabilidade, obtida na tabela de Newell e Macfarlane (MINIM, 2006). Os valores críticos obtidos para os níveis de significância de 5% e 1% foram 49 e 60, respectivamente. Como as diferenças entre a soma total da ordenação das amostras deve ser superior ou igual ao valor crítico, indicando que existe diferença significativa entre as amostras no nível observado, pode-se concluir que o Tratamento 3 é o menos preferido ao nível de 1% de significância em relação à formulação 1 e ao nível de 5% de significância em relação ao Tratamento 4. Já o Tratamento 2 não difere estatisticamente ($p > 0,05$) das demais formulações.

Apesar de não haver diferença estatística do tratamento 2 com os demais, pode-se observar pelo somatório de ordens que a formulação 1 foi a mais preferida pelos julgadores, pois neste teste as notas variaram de 1 a 4, sendo a amostra de

maior preferência classificada com o número 1, a segunda mais preferida com o número 2 e assim por diante. Portanto, o menor somatório de notas define a formulação preferida pelos julgadores, neste caso o Tratamento 1 (somatório de ordens = 249), seguido pelo Tratamento 4 (somatório 269).

Quanto à percepção de ranço, de acordo com a Figura 23, a maioria dos provadores (81,25%) não detectou ranço nas amostras de hambúrguer, ou seja, independente da aplicação de extratos naturais ou do antioxidante sintético BHT, o hambúrguer apresentou, frente aos provadores, o mesmo aroma da amostra controle, que também segundo os julgadores não apresentou ranço.

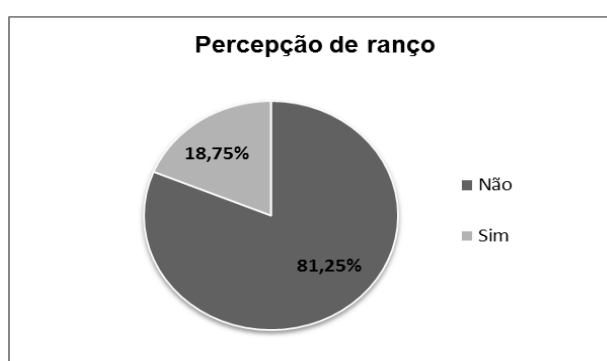


Figura 23 - Percepção de ranço das amostras pelos julgadores em percentual

Uma das grandes preocupações de diversos autores ao desenvolver um novo produto é verificar a intenção de compra pelo consumidor (SANTANA et al., 2006). Os resultados do teste de intenção de compra evidenciaram que 98,21% dos julgadores comprariam os produtos analisados, o tratamento controle apresentou maior intenção de compra (29,06%), seguido do hambúrguer com 0,3% de pólen apícola (26,42%), do padrão (22,02%) e do hambúrguer com 0,3% de extrato de manjerona (20,69%) (Figura 24).

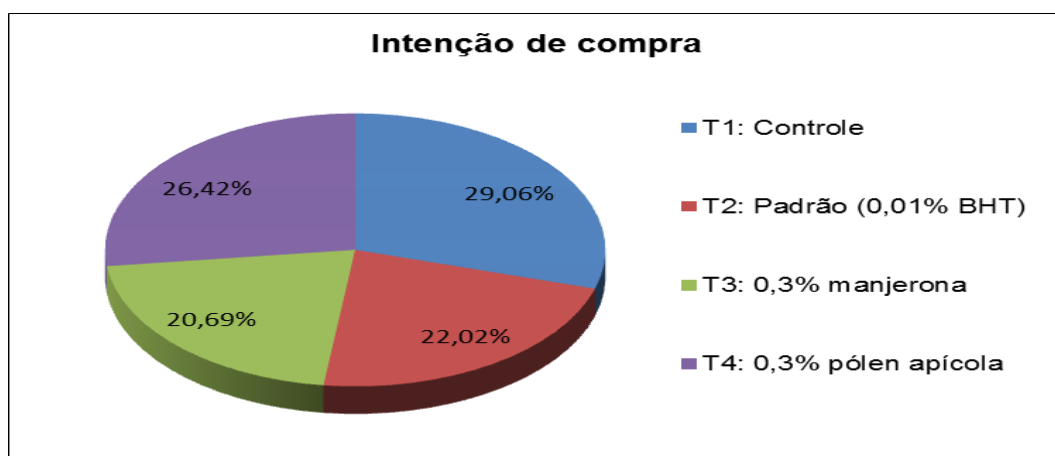


Figura 24 - Intenção de compra das amostras pelos julgadores em percentual

No estudo de Tavares et al. (2007), o produto hambúrguer de coelho, apresentou intenção de compra por parte de 92,26% dos consumidores, contra 7,74% emitindo opinião contrária sobre a compra do produto. Hautrive et al. (2008), ao aplicar o teste de intenção de compra em seus hambúrgueres elaborados com carne de avestruz, concluíram que a intenção de compra é relativa à amostra que os julgadores mais gostaram na aceitação geral pela escala hedônica. Isso condiz com o resultado do presente estudo, que demonstra que grande porcentagem dos julgadores compraria o produto que mais gostou na avaliação global e ordenação da preferência.

6 CONCLUSÃO

Tomando-se os resultados apresentados ao longo deste estudo, pode-se concluir que com exceção do teor de umidade, os demais parâmetros físico-químicos da amostra de pólen apícola orgânico desidratado, estavam em conformidade com a legislação brasileira, indicando a necessidade de melhorias no processo de secagem e armazenagem. Os minerais predominantes foram o magnésio, seguido pelo cálcio, potássio e manganês. O pólen apícola analisado foi considerado fonte de cálcio e zinco; e rico em magnésio, cobre e manganês.

Em termos de taxonomia botânica, a amostra de pólen apícola analisada foi classificada pólen heterofloral. O tipo de pólen encontrado em maior quantidade foi da família *Asteraceae*. No entanto, não houve predominância de uma única espécie botânica, o que indica que as abelhas utilizam flora diversificada para a produção de pólen e outros produtos apícolas no local mencionado.

Com base nos resultados obtidos, observa-se que os extratos etanólicos de pólen apícola e manjerona, apresentaram teores significativos de compostos fenólicos totais. Os flavonoides rutina, miricetina, quercetina e canferol e os ácidos fenólicos, ácido cafêico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido trans-cinâmico foram identificados pela técnica de CLAE-FR nos extratos etanólicos de pólen apícola e manjerona, o que explica a atividade antioxidante destas amostras.

Os valores de IC₅₀ para os extratos variaram de 395,83 µg/mL a 966,21 µg/mL. O extrato de manjerona apresentou o menor valor de IC₅₀ e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante em termos de sequestro do radical DPPH[•]. O maior percentual de atividade antioxidante por este método foi verificado na manjerona (91,04%).

A atividade antioxidante equivalente ao Trolox pelo método ABTS^{•+} variou de 120,10 µmol a 225,52 µmol TEAC/g de amostra. O extrato que apresentou melhor resultado de atividade antioxidante por este método foi o de manjerona. A atividade antioxidante pela redução do ferro – FRAP variou de 60,64 µmol a 216,79 µmol de Fe²⁺/g de amostra. A amostra que conseguiu reduzir maior quantidade de Fe³⁺ em Fe²⁺ foi a manjerona.

E por meio do método do β-caroteno/ácido linoleico a atividade antioxidante variou de 82,41% a 91,93%. Embora o percentual obtido para o pólen apícola tenha

sido superior neste método, ambos os extratos mostraram-se bons percentuais de atividade antioxidante.

Os antioxidantes comerciais usados na indústria alimentícia, BHT, BHA e α -tocoferol, apresentaram percentuais de atividade diferentes entre os métodos de atividade antioxidante empregados, que expressam o valor final em percentagem.

Em função das diferenças de especificidade e sensibilidade entre os métodos não foi possível usar quantidades iguais de todos os extratos em cada teste. Dessa forma, o uso de concentrações distintas nos métodos e as diversas formas de expressar os resultados, torna difícil a comparação.

Os resultados obtidos para composição centesimal dos hambúrgueres elaborados indicam que com exceção do conteúdo de carboidratos, os demais parâmetros analisados estavam de acordo com o estabelecido pelo Padrão de Identidade e Qualidade do produto.

Quanto à oxidação lipídica pelo índice de peróxido, para todos os tratamentos, o resultado foi o mesmo em todos os dias de análise e igual a zero, ou seja, não houve a formação de peróxidos durante o período de estocagem.

Em relação ao índice de TBARS, o tratamento com extrato de manjerona apresentou valores de TBARS inferiores aos demais tratamentos durante todo o período, evidenciando maior proteção oxidativa e demonstrando sua eficiência antioxidante. Contudo, o extrato de pólen apícola também se mostrou efetivo como agente inibidor da oxidação lipídica em hambúrguer, pois apresentou índices de TBARS inferiores aos das amostras controle e padrão. Dessa forma, a concentração utilizada de antioxidantes naturais, foi suficiente para manter a estabilidade oxidativa do produto durante o tempo de armazenamento congelado e todas as amostras permaneceram em estado satisfatório.

Com relação aos parâmetros microbiológicos, todos os tratamentos apresentaram-se em condições sanitárias satisfatórias dentro dos limites de tolerância estabelecidos pela legislação brasileira.

Nas características sensoriais o extrato de pólen apícola mostrou-se com grande potencial quando aplicado em hambúrguer. O índice de aceitabilidade para a avaliação global foram superiores a 70% para os tratamentos controle, padrão e com adição de pólen apícola. Entretanto, a aplicação do extrato de manjerona interferiu negativamente na aceitabilidade dos atributos avaliados, sendo menos preferida e com menor aceitação.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MASSIH, R. M.; RIDA, F.; BAZZI, S.; EL-CHAMI, N.; BAYDOUN, E. The apoptotic and anti-proliferative activity of *Origanum majorana* extracts on human leukemic cell line. **Leukemia Research**, v. 34, p. 1052–1056, 2010.

AHN, M.R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K.S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant Activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7286-7292, 2004.

ALESON-CARBONELL, L.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; KURI, V. Characteristics of beef burger as influenced by various types of lemon albedo. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 247-255, 2005.

ALI, S. S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, v. 41, n. 1, p. 1-15, 2008.

AL-KAHTANI, H. A.; ABU-TARBOUSH, H. M.; BAJABER, A. S. Chemical changes after irradiation and post-irradiation storage in Tilapia and Spanish mackerel. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 61, n. 4, p. 1053-1055, 1996.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; PAMPLONA, L. C.; COIMBRA, S.; BARTH, O. M. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p.105-111, 2005.

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

ANZALDÚA-MORALEZ, A. **La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A, 1994. 220 p.

AOAC. Association of Official Analytical Chemist International. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17.ed. Gaithersburg (MD), 1170p. 2000.

APAK, R.; GÜCLÜ, K.; ÖZYÜREK, M.; KARADEMİR, S. E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7970–7981, 2004.

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

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, v.11, p.419-421, 2000.

ARRUDA, V. A. S.; PEREIRA, A. A. S.; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, p. 100-105, 2013.

ATMANI, D.; CHAHER, N.; BERBOUCHA, M.; AYOUNI, K.; LOUNIS, H.; BOUDAUD, H.; DEBBACHE, N.; ATMANI, D. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. **Food chemistry**, v. 112, p. 303-309, 2009.

BARRETO, L. M. R. C.; FUNARI, S. R. C.; ORSI, R. O. Composição e qualidade do pólen apícola proveniente de sete estados brasileiros e do Distrito Federal. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 62, n. 2, p. 167-175, 2005.

BARRETO, L. M. R. C.; FUNARI, R. C.; ORSI, R.O.; DIB, A.P.S. **Produção de pólen no Brasil**. Taubaté, SP, Cabral Editora e Livraria Universitária, 100p, 2006.

BARRIOS, E. X.; COSTELL, E. Review: Use of Methods of research into consumers' opinions and attitudes in food research. **Food Science and Technology International**, v. 10, n. 12, p. 359-371, 2004.

BARROS, Z. M. P. **Cascas de frutas tropicais como fonte de antioxidante para enriquecimento de suco pronto**. 2011, 84p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2011.

BARTH, O.M. **O pólen no mel no brasileiro**. Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Gráfica Luxor, 1989. 151p.

BARTH, O. M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Scientia Agricola**, v. 61, p. 342-350, 2004.

BASTOS, D. H. M.; ROCHA, C. I.; CUNHA, I. B. S.; CARVALHO, P. O.; TORRES, E. A. S. Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais – Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 3, p. 239-244, 2003.

BATISTA, R. M.; SILVA, L. A. D.; SOUZA, K. M. C.; VILELA, S. C. **Análise microbiológica de hambúrgueres comercializados em sanduicharias tipo “Trailer” na cidade de Anápolis – Goiás**. In: II Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Uni Evangélica, Anais do IX Seminário de PBIC, Anápolis-GO, v. 1, 2011.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 219, p. 561–571, 2004.

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

BOFF, S.; LUZ, C. F. P.; ARAUJO, A. C.; POTT, A. Pollen analysis reveals plants foraged by Africanized honeybees in the Southern Pantanal, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 1, p. 47-54, 2011.

BORBA, C. M.; OLIVEIRA, V. R.; MONTENEGRO, K. R.; HERTZ, P. F.; VENZKE, J. G. Avaliação físico-química de hambúrguer de carne bovina e de frango submetidos a diferentes processamentos térmicos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 24, n. 1, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft Und-technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de alimentos adicionados de nutrientes essenciais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de março de 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Portaria nº 1004, 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 União**, Brasília, DF, 14 de dezembro de 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 20, de 21 de julho de 1999. Oficializa os métodos analíticos físico-químicos, para controle de produtos cárneos e seus ingredientes - sal e salmoura. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 de julho de 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa e Agropecuária. Instrução Normativa Nº 20, de 31 de julho de 2000. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de almôndega, de apesuntado, de fiambre, de hambúrguer, de kibe, de presunto cozido e de presunto. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 de agosto de 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa e Agropecuária. Instrução Normativa Nº 03, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geleia real, geleia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de setembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução - RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 de setembro de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 51, de 29 de dezembro de 2006. Adota o regulamento técnico de atribuição de aditivos, e seus limites das seguintes categorias de alimentos: carne e produtos cárneos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 04 de janeiro de 2007.

BRUM, F. B. **Antioxidante natural de marcela (*Achyrocline Satureioides*) e de erva mate (*Ilex Paraguariensis*) na elaboração de linguiça toscana**. 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2009.

BRUM, F. B.; MACAGNAN, F. T.; MONEGO, M. A.; KAMINSKI, T. A.; SILVA, L. P. Aplicação de ácido fítico em produto cárneo tipo hambúrguer. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 47-52, 2011.

BUSATTA, C.; VIDAL, R. S.; POPIOLSKI, A. S.; MOSSI, A. J.; DARIVA, C.; RODRIGUES, M. R. A.; CORAZZA, F. C.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V.; CANSIAN, R. L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v. 25, p. 207-211, 2008.

CABRAL, I. S. R. **Extratos de algas marinhas como agentes antioxidantes e antimicrobianos e seus efeitos na qualidade de *Minced* de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2012. 138p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2012.

CARPES, S. T.; BEGNINI, R.; ALENCAR, S. M.; MASSON, M. L. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1818-1825, 2007.

CARPES, S.T.; PRADO, A.; MORENO, I. A. M.; MOURÃO, G. B.; ALENCAR, S. M.; MASSON, M. L. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região Sul do Brasil. **Química Nova**, v.31, n.7, p. 1660-1664, 2008.

CARPES, S. T.; CABRAL, I. S. R.; LUZ, C. F. P.; CAPELETTI, J. P.; ALENCAR, S. M.; MASSON, M. L. Palynological and physicochemical characterization of *Apis mellifera* L. bee pollen in the Southern region of Brazil. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 7, p. 667-673, 2009.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Editora: Unicamp, Campinas, São Paulo, 1999.

CERESER, N. D.; COSTA, F. M. R.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; SILVA, D. A. R.; SPEROTTO, V. R. Botulismo de origem alimentar. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 280-287, 2008.

CHAN, E. W. C.; KONG, L. Q.; YEE, K. Y.; CHUA, W. Y.; LOO, T. Y. Antioxidant and antibacterial properties of some fresh and dried *Labiatae* herbs. **Free Radicals and antioxidants**, v. 2, n. 3, 2012.

CHENG, N.; REN, N.; LEI, X.; ZHENG, J.; CAO, W. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl₄-induced acute liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 234-240, 2013.

CHIRINOS, R. R. O.; VIZEU, D. M.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M. Inactivation of *Escherichia coli* O157H7 in hamburger by gamma radiation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 45-48, 2002.

CIRIANO, M. S.; GARCÍA-HERREROS, C.; VALENCIA, E. L. I.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Use of natural antioxidants from lyophilized water extracts of *Borago officinalis* in dry fermented sausages enriched in ω -3 PUFA. **Meat Science**, Barking, v. 83, n. 2, p. 271-277, 2009.

COHEN, M.; ROBINSON, R. S.; BHAGAVAN, H. Antioxidants in dietary lipids. In: CHOW, C. K. **Fatty acids in foods and their health implications**. New York: Marcel Dekker, 2000.

CORREIA-OLIVEIRA, M. E.; FERREIRA, A. F.; PODEROSO, J. C. M.; LESSA, A. C. V.; ARAÚJO, E. D.; CARNELOSSI, M. A. G.; RIBEIRO, G. T. Atividade de água (Aw) em amostras de pólen apícola desidratado e mel do estado de Sergipe. **Revista da Fapese**, v. 4, n. 2, p. 27-36, 2008.

DALLA SANTA, O. R. **Avaliação da qualidade de salames artesanais e seleção de culturas starter para a produção de salame tipo Italiano**. 2008. 147p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2008.

DAMASIU, J.; VENSKUTONIS, P. R.; FERRACANE, R.; FOGLIANO, V. Assessment of the influence of some spice extracts on the formation of heterocyclic amines in meat. **Food Chemistry**, v. 126, p. 149-156, 2011.

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

D'APOLITO, C.; PESSOA, S. M.; BALESTIERI, F. C. L. M.; BALESTIERI, J. B. P. Pollen harvest by *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera*: Apidae) in the Dourados region,

Mato Grosso do Sul state (Brazil). **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 898-904, 2010.

DEL RIO, D.; COSTA, L. G.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Polyphenols and health: what compounds are involved? **Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.20, n.1, p. 1–6, 2010.

DORMAN, H. J.; BACHMAYER, O.; KOSAR, M.; HILTUNEN, R. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected *Lamiaceae* species grown in Turkey. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 52, n. 4, p. 762–770, 2004.

DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**. 2 ed. rev. e ampl. Curitiba, PR: Champagnat, 2007. 239p.

EMMONS, C. L.; PETERSON, D. M.; PAUL, G. L. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and content of phenolic and tocol antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 4894-4898, 1999.

ESTEVINHO, L. M.; RODRIGUES, S.; PEREIRA, A. P.; FÉAS, X. Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, p. 429-435, 2012.

FANATICO, A. C.; CAVITT, L. C.; PILLARI, P. B.; EMMERT, J. L.; OWENS, C. M. Evaluation of slower-growing broiler genotypes grown with and without access: meat quality. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, n. 8, p. 1785-1790, 2005.

FERREIRA, E. L.; SAMPAIO, G. R.; TORRES, E. A. F. S.; BASTOS, D. H. M. Natural Antioxidant from yerba maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) prevents hamburger peroxidation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 803-809, 2011.

FERREIRA, M. S.; MÁRSICO, E. T.; MEDEIROS, R. J.; POMBO, C. R.; FREITAS, M. Q.; SÃO CLEMENTE, S. C.; CONTE-JUNIOR, C. A. Comparação das características físico-químicas e sensoriais de hambúrgueres de carne bovina elaborados com cloreto de sódio, polifosfato e transglutaminase. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 1, p. 52-60, 2012.

FERREIRA, V. L. P., coord. **Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos** (Manual: Série Qualidade). Campinas: SBCTA, PROFIQUA, 2000. 127 p.

FORELL, S. C. P.; RANALLI, N.; ZARITZKY, N. E.; ANDRÉS, S. C.; CALIFANO, A. N. Effect of type of emulsifiers and antioxidants on oxidative stability, color and fatty acid profile of low-fat beef burgers enriched with unsaturated fatty acids and phytosterols. **Meat Science**, v. 86, p. 364-370, 2010.

FORTUNA, J. L.; NASCIMENTO, E. R.; FRANCO, R. M. Correlação entre contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e isolamento de *Salmonella* spp. em hambúrgueres crus. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 59-63, 2013.

FREIRE, K. R. L.; LINS, A. C. S.; DÓREA, M. C.; SANTOS, F. A. R.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. **Molecules**, v. 17, p. 1652-1664, 2012.

GARCIA, C. C.; COSTA, B. J.; VECHIATTO, W. W. D.; ZAGONEL, G. F. SUCHEK, E. M.; FILHO, N. R. A.; LELES, M. I. G. Estudo comparativo da estabilidade oxidativa de diferentes biodiesel por termogravimetria e teste Rancimat. **Biodiesel**, p. 263-267, 2006.

GARCÍA, M. L.; CALVO, M. M.; SELGAS, M. D. Beef hamburgers enriched in lycopene using dry tomato peel as an ingredient. **Meat Science**, v. 83, p. 45-49, 2009.

GEORGANTELIS, D.; BLEKAS, G.; KATIKOU, P.; AMBROSIADIS, I.; FLETOURIS, D. J. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on lipid oxidation and color stability during frozen storage of beef burgers. **Meat Science**, v. 75, p. 256-264, 2007.

GONZÁLEZ, G.; HINOJO, M. J.; MATEO, R.; MEDINA, A.; JIMÉNEZ, M. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, N.1, p. 1-9, 2005.

GRAIKOU, K.; KAPETA, S.; ALIGIANNIS, N.; SOTIROUDIS, G.; CHONDROGIANNI, N.; GONOS, E.; CHINOU, I. Chemical analysis of Greek pollen - Antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. **Chemistry Central Journal**, v. 33, n. 5, p. 1-9, 2011.

GUERRERO, L. Estudios de consumidores: análisis de los errores más habituales. In: ALMEIDA, T. C. A.; HOUGH, G.; DAMÁSIO, M. H.; SILVA, M. A. A. P. **Avanços em Análise Sensorial**. São Paulo: Varela, p. 121-129, 1999. 286p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 280, n. 1, p. 1-8, 1990.

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

HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, p. 2023-2044, 2012.

HAMINIUK, C. W. I.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; GUEDES, A. R.; STAFUSSA, A. P.; BONA, E.; CARPES, S. T. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, p.1529-1537, 2011.

HAUTRIVE, T. P.; OLIVEIRA, V. R.; SILVA, A. R. D.; TERRA, N. N.; CAMPAGNOL. P. C. B. Análise físico-química e sensorial de hambúrguer elaborado com carne de avestruz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 95-101, 2008.

HELGESEN, H.; SOLHEIM, R.; NAES, T. Consumer preference mapping of dry fermented lamb sausages. **Food Quality and Preference**, Braking, v. 8, n. 2, p. 97-109, 1997.

HOOGENKAMP, H.W. Meat Patties: formulating for today's consumer. **Meat International**, v. 6, n. 6, p. 30-32, 1996.

HOSSAIN, M. B.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A. B.; BRUNTON, N. P. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 126, p. 339–346, 2011.

HOSSAIN, M. B.; BRUNTON, N. P.; PATRAS, A.; TIWARI, B.; O'DONNELL, C. P.; MARTIN-DIANA, A. B.; BARRY-RYAN, C. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. **Ultrasonic Sonochemistry**, v. 19, p. 582-590, 2012.

HUBER, E. **Desenvolvimento de produtos cárneos reestruturados de frango (hambúrguer e empanado) com adição de fibras vegetais como substitutos totais de gordura**. 2012. 221 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2012.

HUR, S. J.; PARK, G. B.; JOO, S. T. Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. **Food Control**, v. 18, n. 8, p. 939-947, 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, Versão eletrônica**, 4. ed. São Paulo: IAL, 2008.

JUN, W. J.; HAN, B. K.; YU, K. W.; KIM, M. S.; CHANG, I. S.; KIM, H. Y.; CHO, H. Y. Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals. **Food Chemistry**, v. 75, p. 439–444, 2001.

KASSEM, G. M.; ATTA-ALLA, O. A.; ALI, F. H. M. Improving the quality of beef burger by adding thyme essential oil and jojoba oil. **Archives de Zootechnia**, v. 60, n. 231, p. 787-795, 2011.

KUKIC, J.; POPOVIC, V.; PETROVIC, S.; MUCAJI, P.; CIRIC, A.; STOJKOVIC, D.; SOKOVIC, M. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 861-868, 2008.

KUKKANEN, A. T.; PÖLÖNEN, S. S.; KÄRENLAMPI, S. O.; KOKKO, H. I. Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 112-119, 2006.

KULISIC, T.; DRAGOVIC-UZELAC, V.; MILOS, M. Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n.4, p. 485–492, 2006.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LEBLANC, B. W.; DAVIS, O. K.; BOUE, S.; DELUCCA, A.; DEEBY, T. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1299–1305, 2009.

LEE, E. S.; LEE, H. E.; SHIN, J. Y.; YOON, S.; MOON, J. O. The flavonoid quercetin inhibits dimethyl nitrosamine-induced liver damage in rats. **Journal Pharmaceutics Pharmacology**, 55, 1169–1174, 2010.

LEONARDI, D. S.; FERES, M. B. C.; PORTARI, G. V.; JORDÃO, A. A. Determinação do valor energético de hambúrgueres e almôndegas através da calorimetria direta e da composição centesimal. Comparação com informações nutricionais apresentadas nas embalagens. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 5, p. 141-148, 2009.

LIMA, J. R. Caracterização físico-química e sensorial de hambúrguer vegetal elaborado à base de caju. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n.1, p. 191-195, 2008.

LIMA, J. R.; BRUNO, L. M.; SOUZA NETO, M. A. Estabilidade durante armazenamento de hambúrguer vegetal elaborado à base de caju. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 43, p. 1-20, 2011.

LIU, Q.; LANARI, C.; SCHAEFER, D. M.A. A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 3131-3140, 1995.

LOUVEAUX, J.. Les relations abeilles-pollens. **Bulletin de la Société Botanique de France**, v. 137, p. 121-131, 1990.

LUZ, C. F. P.; BACHA JUNIOR, G. L.; FONSECA, R. L. S. E.; SOUSA, P. R. Comparative pollen preferences by Africanized honeybees *Apis mellifera* L. of two colonies in Pará de Minas, Minas Gerais, Brazil. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 82, n. 2, p. 293-304, 2010.

MARCHINI, L. C.; REIS, V. D. A.; MORETI, A. C. C. C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas Africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v. 36, p. 949–953, 2006.

MARGHITAS, L. A.; STANCIU, O. G.; DEZMIREAN, D. S.; BOBIS, O.; POPESCU, O.; BOGDANOV, S.; CAMPOS, M. G. *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. **Food Chemistry**, v. 115, p. 878–883, 2009.

MARIUTTI, L. R. B.; ORLIEN, V.; BRAGAGNOLO, N.; SKIBSTED, L. H. Effect of sage and garlic on lipid oxidation in high-pressure processed chicken meat. **European Food Research Technology**, v. 227, p. 37–44, 2008.

MARQUES, J. M. **Elaboração de um produto de carne bovina “tipo hambúrguer” adicionado de farinha de aveia**. 2007. 71p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

MATHIAS, S. P.; ROSENTHAL, A.; GASPAR, A.; DELIZA, R.; SLOGO, A. P.; VICENTE, J.; MASSON, L. M.; BARBOSA, C. Alterações oxidativa (cor e lipídios) em presuntos de peru tratado por alta pressão hidrostática (APH). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 4, p. 852-857, 2010.

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, 2002.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MELO, I. L. P.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Comparison of methodologies for moisture determination on dried bee pollen samples. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, p. 194–197, 2011.

MELO, L. F.; VILELA, N. A.; CARVALHO, P. L. N.; VEIGA, S. M. O. M.; NASCIMENTO, L. C. Qualidade higiênico-sanitária da carne de hambúrguer industrializada. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 2, p. 370-375, 2012.

MENDES, T. F. **Optimização de Produtos Reestruturados de Carne de Perna de Borrego**. 2011. 97p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

MENESES, S. M. O.; MOLINA, D. A. R.; VARGAS, J. H. L. CARACTERIZACIÓN Microbiológica y bromatológica de hamburguesas bajas en grasa con adición de fibra de banana verde integro. **Revista Facultad Nacional Agropecuarias Medellín**, v. 64, n.1, p. 5993-6005, 2011.

MENEZES, J. D. S.; MACIEL, L. F.; MIRANDA, M. S.; DRUZIAN, J. I. Compostos bioativos e potencial antioxidante do pólen apícola produzido por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 233-42, 2010.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127–130, 2001.

MESSIAS, K. L. S. Os antioxidantes. **Foods ingredients Brasil**, n. 6, p. 16, 2009.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial: Estudos com Consumidores**. Viçosa: Ed. UFV, 2006. 225p.

MIYAGUSKU, L.; THOMAZINI, M.; KUAYE, A. Y.; CASTILLO, C. J. C. Avaliação do valor de TBARS em coxas de frangos irradiadas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p. 45-49, 2007.

MODRO, A. F. H.; MESSAGE, D.; LUZ, C. F. P.; MEIRA NETO, J. A. A. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p.1057-1065, 2007.

MOHAMED, H. M. H.; MANSOUR, H. A. Incorporating essential oils of marjoram and rosemary in the formulation of beef patties manufactured with mechanically deboned poultry meat to improve the lipid stability and sensory attributes. **LWT – Food Science and Technology**, v. 45, p. 79-87, 2012.

MOHAMED, H. M. H.; MANSOUR, H. A.; FARAG, M. D. E. H. The use of natural herbal extracts for improving the lipid stability and sensory characteristics of irradiated ground beef. **Meat Science**, v. 87, p. 33-39, 2011.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2003.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655–1666, 2009.

MORAIS, M.; MOREIRA, L.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L. M. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1096–1101, 2011.

MORETI, A. C. C. C.; MARCHINI, L. C.; SOUZA, V. C.; RODRIGUES, R. R. Atlas do pólen de plantas apícolas. **Papel Virtual**, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2002.

MORGANO, M. A.; MARTINS, M. C. T.; RABONATO, L. C.; MILANI, R. F.; YOTSUYANAGI, K.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A comprehensive investigation of the mineral composition of Brazilian bee pollen: geographic and seasonal variations and contribution to human diet. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 23, n. 4, p. 727-736, 2012.

NAGAI, T.; INOUE, R.; SUZUKI, N.; TANOUE, Y.; KAI, N.; NAGASHIMA, T. Antihypertensive activities of enzymatic hydrolysates from honeybee-collected pollen of *Cistus ladaniferus*. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 5, p. 86-89, 2007.

NASCIMENTO, M. G. F.; OLIVEIRA, C. Z. F.; NASCIMENTO, E. R. Hambúrguer: Evolução comercial e padrões microbiológicos. **Boletim CEPPA**, v. 23, n. 1, p. 59-74, 2005.

NASSARL, M. P. M.; ALMEIDA, V. C. N.; RODRIGUES, V. P.; LEONARDO, L.; AKL, E. R. Reestruturados e empanados (*nuggets*) de carne bovina: estudo da aceitação sensorial por alunos na alimentação escolar no município de Barretos, SP. **Ciência e Cultura – Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário da FEB**, v. 8, n. 1, p. 65-74, 2012.

NEGRI, G.; TEIXEIRA, E. W.; ALVES, M. L. T. M. F.; MORETI, A. C. C. C.; OTSUK, I. P.; BORGUINI, R. G.; SALATINO, A. Hydroxycinnamic acid amide derivatives, phenolic compounds and antioxidant activities of extracts of pollen samples from Southeast Brazil. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 59, p. 5516–5522, 2011.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, 2009.

NOVAIS, J. S.; LIMA, L. C. L.; SANTOS, F. A. R. Bee pollen loads and their use in indicating flowering in the Caatinga region of Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 74, p. 1355-1358, 2010.

OLDONI, T. L. C. **Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais**. 2010. 163p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2010.

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

OLIVEIRA, C. A. **Avaliação da atividade antioxidante do extrato de erva-cidreira-de arbusto (*Lippia alba* (Mill) NE Brown) em embutido cozido a base de carne ovina de descarte**. 2011. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2011.

OLIVO, R. **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. Criciúma, SC: Ed. do autor, p. 533-542, 2006.

ORDÓÑEZ PEREDA, J. A.; CAMBERO RODRÍGUEZ, M. I.; FERNÁNDEZ ÁLVARES, L.; GARCIA SANZ, M, L. (Org.). **Tecnologia de alimentos: Alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, v.2, 2005. 279 p.

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

ÖZYÜREK, M.; BEKTASOGLU, B.; GÜÇLÜ, K.; GÜNGÖR, N.; APAK, R. Simultaneous total antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone–water solution containing 2% methyl- β -cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. **Analytical Chemical Act**, v. 630, p. 28-39, 2008.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. 2. ed. rev. e ampl., Goiânia: UFG, 2006. 1150p.

PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BATISDA, J.; ROSAS-ROMERO, A.; FLERLAGE, N.; BURILLO, J.; CODINA, C. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.23, p. 6882-6890, 2002.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; SATO, H. H.; CONTADO, J. L. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n.4, p. 1235-1259, 1995.

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

PINHEIRO, R. S.; BIANCHIN, M.; HAMINIUK, C. W. I.; CARPES, S. T. **Atividade Antioxidante in vitro de extratos de Manjerona (*Origanum majorana*) e Manjericão (*Ocimum basilicum*)**. In: XI Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, XI ERSCTA. Curitiba: SBCTA, v. 1, 2011.

PINTO, B.; CACIAGLI, F.; RICCIO, E.; REALI, D.; SARIC, A.; BALOG, T.; LIKIC, S.; SCARPATO, R. Antiestrogenic and antigenotoxic activity of bee pollen from *Cystus incanus* and *Salix alba* as evaluated by the yeast estrogen screen and the micronucleus assay in human lymphocytes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 4122-4128, 2010.

PINTO, F. A.; CAMPOS, C. N.; BARRETO, L. M. R. C. Perfil físico-químico do pólen apícola produzido em Taubaté, Vale do Paraíba, sudeste do Brasil. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 20, p. 1-6, 2012.

POIROUX-GONORD, F.; BIDEL, L. P.; FANCIULLINO, A. L.; GAUTIER, H.; LAURI-LOPEZ, F.; URBAN, L. Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 12065–12082, 2010.

POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidantes de los alimentos**. Editora: Acribia, Zaragoza, Espanha, 2005.

PROESTOS, C.; KOMAITIS, M. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 652–659, 2008.

QIAN, W. L.; KHAN, Z.; WATSON, D. G.; FEARNLEY, J. Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 78-83, 2008.

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

RACANICCI, A. M. C.; MENTEN, J. F. M.; IAFIGLIOLA, M. C.; GAIOTTO, J. B.; PEDROSO, A. A. Efeito da adição do antioxidante BHT e do armazenamento sobre a qualidade da farinha de carne e ossos para frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 2, n. 2, p. 155-161, 2000.

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

RAMÍREZ, R.; MONTENEGRO, G. Certificación del origen botánico de miel y polen corbículas pertenecientes a la comuna de Litueche, VI Región de Chile, **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 31, n. 3, p. 197-211, 2004.

RAVELLI, D. **Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias: correlação entre parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial**. 2011. 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2011.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radicals Biology and Medicinal**, v.26, p.1231-1237, 1999.

ROBY, M. H. H.; SARHAN, M. A.; SELIM, K. A. H.; KHALEL, K. I. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds ind thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 827-831, 2013.

RODRIGUES, F. **Avaliação sensorial e atividade antimicrobiana de diferentes condimentos vegetais em preparação alimentar com frango cozido**. 2009. 43p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

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

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado Técnico 125**, Embrapa - Fortaleza, CE, 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. **Comunicado Técnico 128**, Embrapa - Fortaleza, CE, 2007.

RUFINO, M. S. M. **Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais**. 2008. 237f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, 2008.

SANTANA, L. R. R.; SANTOS, L. C. S.; NATALICIO, M. A.; MONDRAGON-BERNALS, O. L.; ELIAS, E. M.; SILVA, C. B.; ZEPKA, L. Q.; MARTINS, I. S. L.; VERNAZA, M. G.; CASTILLO-PIZARRO, C.; BOLINI, H. M. A. Perfil sensorial de iogurte light, sabor pêssego. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.3, p. 619-625, 2006.

SELANI, M. M.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; SHIRAHIGUE, L. D.; GALLO, C. R.; PLATA-OVIEDO, M.; MONTES-VILLANUEVA, N. D. Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. **Meat Science**, v. 88, p. 397-403, 2011.

SELLAMI, I. H.; MAAMOURI, E.; CHAHED, T.; WANNES, W. A.; KCHOUK, M. E.; MARZOUK, B. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 395–402, 2009.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phenolics in food and nutraceuticals. **Trends in Food Science and Technology**. v. 16, p. 171-176, 2005.

SHIRAHIGUE, L. D.; PLATA-OVIEDO, M.; ALENCAR, S. M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; VIEIRA, T. M. F. S.; OLDONI, T. L. C.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. Wine industry residue as antioxidant in cooked chicken meat. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 5, p. 863–870, 2010.

SILVA, A. S.; ARAÚJO, S. B.; SOUZA, D. C.; SILVA, F. A. S. Study of the Cu, Mn, Pb and Zn dynamics in soil, plants and bee pollen from the region of Teresina (PI), Brazil. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 84, n. 4, p. 881-889, 2012.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVA, F. A. S. E.; DUARTE, M. E. M.; CAVALCANTI-MATA, M. E. R. M. Nova metodologia para interpretação de dados de análise sensorial de alimentos. **Revista Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.30, n. 5, p.967-973, 2010.

SILVA, M. F. G.; BIANCHIN, M.; HAMINIUK, C. W. I.; PORCU, O. M.; SCHMIDT, C. A. P.; SERAFINI, L. F.; FERRARI, A. P.; MARCHESE, J. A.; CABRAL, I. S. R.; CARPES, S. T. **Comparative study of two aromatic plants in relation to their antioxidant potential**. In: 16th World Congress of Food Science and Technology and XVII Latin American Seminar of Food Science and Technology - ALACCTA, 2012, Foz do Iguaçu, 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007, 536p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Varela, 2010. 552p.

SILVEIRA, T. A. **Caracterização sazonal do pólen apícola quanto à origem botânica, aspectos físico-químicos e elementos traços como bioindicadora de poluição ambiental**. 2012, 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2012.

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

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol and vitamins C and E against ABTS, DPPH and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 1077–1080, 2003.

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

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, E. P.; MORI, E.; LEMOS, D. M.; SOUSA, F. C.; SILVA, L. M. M. Análise química da formulação de hambúrguer enriquecido com fibras da casca de melancia desidratadas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 1, p. 96-101, 2012.

ST. ANGELO, A. J.. Lipid oxidation in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, n. 3, p. 175-224, 1996.

STANCIU, O. G., MARGHITAS, L. A., DEZMIREAN, D., CAMPOS, M. G. A comparison between the mineral content of flower and honeybee collected pollen of selected plant origin (*Helianthus annuus* L. and *Salix* sp.). **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, n. 4, p. 1-6, 2011.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: Biology, Biochemistry, Management**. Springer-Verlag, Berlin, p. 95-110, 1974.

STIKA, J. F.; XIONG, Y. L.; SUMAN, S. P.; BLANCHARD, S. P.; MOODY, W. G. Frozen storage stability of antioxidant-treated raw restructured beef steaks made from mature cows. **Meat Science**, v. 77, p. 1-8, 2007.

SU, S. I. T.; YOSHIDA, C. M. P.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; QUIÑONES, E. M.; VENTURINI, A. C. Okara, a soymilk industry by-product, as a non-meat protein source in reduced fat beef burgers. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, p. 52-56, 2013.

TAVARES, R. S.; CRUZ, A. G.; OLIVEIRA, T. S.; BRAGA, A. R.; REIS, F. A.; HORA, I. M. C.; TEIXEIRA, R. C.; FERREIRA, E. F. Processamento e aceitação sensorial do hambúrguer de coelho (*Orytolagus cunicullus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 633-636, 2007.

TEIXEIRA, E. M. B. **Caracterização química e nutricional da folha de moringa (*Moringa oleifera* Lam.)**. 2012. 94f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, SP, 2012.

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

TERRA, N. N. Fermentação Cárneas: Princípios e Inovações. In: SHIMOKOMAKI, M. et al. **Atualidades em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p. 29-36. 2006.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2010.

TORRES, E. A. F. S.; OKANI, E. T. Teste de TBA: ranço em alimentos. **Revista Nacional da Carne**, v. 243, p. 68-76, 1997.

TRINDADE, R. A.; LIMA, A.; ANDRADE-WARTHA, E. R.; SILVA, A. M. O.; MANCINI-FILHO, J.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Consumer's evaluation of the effects of gamma irradiation and natural antioxidants on general acceptance of frozen beef Burger. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, p. 293-300, 2009.

TRINDADE, R. A.; MANCINI-FILHO, J.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Natural antioxidants protecting irradiated beef burgers from lipid oxidation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 98–104, 2010.

VÁGI, E.; SIMÁNDI, B.; SUHAJDA, Á.; HÉTHELYI, É. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. **Food Research International**, v. 38, p. 51–57, 2005.

VENTURINI, A. C.; CAVENAGHI, Â. D.; COTRERAS-CASTILLO, C. J.; QUIÑONES, E. M. Sensory and microbiological evaluation of uncured fresh chicken sausage with reduced fat content. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 3, p. 629-634, 2011.

VIEIRA, V. B. **Obtenção do extrato de própolis assistida por micro-ondas, aplicação em linguiça toscana e avaliação da sua capacidade antioxidante**. 2012. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2012.

VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 712p.

VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Feete, Seifen Anstrichmittel**, New York, v. 72, n. 12, p. 1084-1087, 1970.

WEBER, C. I. **Extração de fitase endógena de farelo de arroz integral sua aplicação na produção de ingrediente com baixo teor de ácido fítico e avaliação da adição em dietas para frangos de corte**. 2012. 103f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2012.

XU, X.; GAO, Y.; SUN, L. Free and esterified triterpene alcohol composition of bee pollen from different botanical origins. **Food Research International**, v. 48, p. 650–656, 2012.

XUE, X.; ZHAO, J.; CHEN, L.; ZHOU, J.; YUE, B.; LI, Y.; WU, L.; LIU, F. Analysis of coenzyme Q10 in bee pollen using online cleanup by accelerated solvent extraction and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 133, p. 573–578, 2012.

ZAMBIAZI, R. C. Oxidation reactions of vegetable oils and fats. **Boletim do SBCTA**, v. 33, p. 1-7, 1999.

ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; BATTAGLIA, A.; CHIZZOLINI, R. Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. **Meat Science**, v. 66, n. 2, p. 415-423, 2004.

ANEXOS

ANEXO A – Trabalho apresentado em evento científico

Leila F. Serafini, Carla A. P. Schmidt, Mariéli Karling, Paula D. Vecchia, Ieda C. Schleger, Ingridy S. R. Cabral, Solange T. Carpes. Evaluation of antioxidant potential of organic bee pollen heterofloral of *Apis mellífera*: a comparative study between two conditions of extraction. In: **16th World Congress of Food Science and Technology - IUFosT e XVII Latin American Seminar of Food Science and Technology - ALACCTA**, 2012, Foz do Iguaçu – Paraná. Aceito para apresentação.

Evaluation of antioxidant potential of organic bee pollen heterofloral of *Apis mellífera*: a comparative study between two conditions of extraction

Leila F. Serafini¹, Carla A. P. Schmidt¹, Mariéli Karling², Paula D. Vecchia², Ieda C. Schleger³, Ingridy S. R. Cabral⁴, Solange T. Carpes^{1,2}

Bee pollen is the subject of studies due to its high nutritional value, and provides health benefits, mainly by the presence of phenolic compounds with antioxidant activity. The aim of this study was to determine the phenolics and total flavonoids content in ethanolic extracts of bee pollen organic heterofloral (EEPAOH) obtained by two extraction methods, as well as evaluating the antioxidant activity and compare them with the commercial antioxidants. The extracts were prepared with 80% ethanol in water bath at 70 °C/30 min and Shaker at 40 °C/60 min. The content of total flavonoids and phenolic compounds was determined using Folin-Ciocalteu and aluminum chloride, respectively. The antioxidant activity was determined by the ABTS radical scavenging and inhibition of coupled carotene/linoleic acid oxidation. The values obtained for total phenolics and flavonoids for EEPAOH (water bath) were 17.70±0.16 mg GAE/g of pollen (2.66mg/mL) and 6.60±0.07 mg quercetin/g (13.3mg/mL) respectively, and the EEPAOH (Shaker) 19.69±0.14 mg GAE/g (2mg/mL) and 6.82±0.05 mg quercetin/g (10mg/mL) respectively. The antioxidant activities obtained by the ABTS and carotene/linoleic acid for EEPAOH (water bath) was 95.87±0.16 µmol trolox/g and 92.41±0.41% at a concentration of 13.3 mg/mL, respectively, and EEPAOH (Shaker) showed 120.10±0.21 µmol trolox/g and 90.79±0.56% at 10mg/mL, respectively. In general, the extraction in Shaker demonstrated slight superiority in the phenolic compounds and flavonoids extraction and antioxidant activity analyzed. Both extracts showed lower antioxidant potential to the BHA, BHT and α-tocopherol antioxidants. However, pollen extracts can be considered a potential source of antioxidants with employment in food and pharmaceutical industries.

¹ Post-graduation Program of Chemical and Biochemical Process, Federal University of Technology Paraná – UTFPR (PPGTP), CEP: 85503-390, Pato Branco-PR, Brazil.

² Department of Chemical, Federal University of Technology Paraná – UTFPR, Pato Branco-PR, Brazil.

³ Biologist, Organic Program, Breyer & Cia Ltda, União da Vitória-PR, Brazil.

⁴ Center of Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo- USP, Piracicaba-SP, Brazil.



LETTER OF ACCEPTANCE

CONGRATULATIONS !!!

We are pleased to inform you that your abstract entitled "EVALUATION OF ANTIOXIDANT POTENTIAL OF ORGANIC BEE POLLEN HETEROFLORAL of *Apis mellifera*: A COMPARATIVE STUDY BETWEEN TWO CONDITIONS OF EXTRACTION" by Serafini, Leila F.; Schmidt, Carla A. P.; Mariéli Karling; Vecchia, Paula D.; Schleger, Ieda C.; Cabral, Ingridy S. R.; Carpes, Solange. T..

submitted to the 16th World Congress of Food Science and Technology - IUFoST - "**Addressing Global Food Security and Wellness through Food Science and Technology**" was **ACCEPTED** for presentation.

Presentation type: poster

We are looking forward to seeing you soon.

Sincerely,

Delia B. Rodriguez-Amaya

Prof. Dr. Delia B. Rodriguez-Amaya

Scientific Committee Chair

Check our website www.iufost.org.br for the date of presentation of your paper after May 31, 2012.

ANEXO B – Aprovação do comitê de ética na pesquisa – UTFPR

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA ORGÂNICO E MANJERONA (*Origanum majorana* L.) EM HAMBURGUERES DE CARNE BOVINA.

Área Temática: Área 5. Novos procedimentos ainda não consagrados na literatura.

Pesquisador: Solange Teresinha Carpes

Versão: 1

Instituição: UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ ((UTFPR))

CAAE: 03946712.0.0000.5547

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 46316

Data da Relatoria: 28/06/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto cujo título é AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA ORGÂNICO E MANJERONA (*Origanum majorana* L.) EM HAMBURGUERES DE CARNE BOVINA está sob a responsabilidade da docente Profa Solange T. Carpes, da UTFPR, campus PB.

Objetivo da Pesquisa:

Este estudo tem como principal objetivo avaliar as propriedades antioxidantes de manjerona (*Origanum majorana* L.) e de pólen apícola durante o processamento e armazenamento de produtos cárneos como hambúrguer.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ao relatar os BENEFÍCIOS, a pesquisadora afirma que:

Essa pesquisa não apresentará benefícios imediatos ao sujeito da pesquisa, apenas como fonte de dados para a especificação futura de um produto."

Considerando os riscos, mesmo que mínimos, se os julgadores sentirem desconforto ... Caso o participante apresente qualquer tipo de desconforto ou caso seja identificada alguma reação adversa, este deverá consultar os responsáveis pela pesquisa que tomarão as medidas necessárias de modo a encaminhá-los aos procedimentos médicos caso haja necessidade."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem qualidade técnica, e, os profissionais segundo "cv. lattes" demonstram experiência no campo de pesquisa selecionado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Atendido.

Recomendações:

Atendido.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-UTFPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

CURITIBA, 28 de Junho de 2012

Assinado por:
Thomaz Aurélio Pagioro

ANEXO C- Termo de consentimento livre e esclarecido



Ministério da Educação
 Universidade Tecnológica Federal do Paraná
 Campus Pato Branco
 Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos
 Químicos e Bioquímicos



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA ORGÂNICO E MANJERONA (*Origanum majorana* L.) EM HAMBURGUERES DE CARNE BOVINA.

Pesquisador responsável e colaboradores com telefones de contato: Solange Teresinha Carpes (46) 3220-2596, Leila Fernanda Serafini (46) 8803-2252.

Convidamos a participar de nosso projeto que tem o objetivo de avaliar a aceitabilidade e as características sensoriais, como por exemplo, cor, sabor, odor de ranço e aparência de hambúrguer de carne bovina com extratos de manjerona e pólen apícola. Para isso será realizado o seguinte tratamento a sua pessoa, que consiste em provar o produto cárneo para avaliação do sabor e analisá-lo para julgar os atributos cor, odor de ranço e aparência. As formulações do produto serão acompanhadas de um copo de água e biscoito tipo água e sal para ser utilizado pelo provador entre as amostras, para limpeza das papilas gustativas.

Durante a execução do projeto caso sinta algum desconforto, tais como intolerância a um constituinte específico, de natureza alérgica ou queira alguma informação detalhada sobre o produto, os pesquisadores estarão presente ou podem ser encontrados pelos telefones: (46)3220-2596 e (46)8803-2252. Após encerrada a pesquisa, poderá ainda entrar em contato conosco, caso haja algum problema advindo de sua participação no Projeto. Se ocorrer alguma espécie de dano físico ou psicológico, providenciaremos seu encaminhamento ao atendimento adequado, sem gerar ônus para a Instituição. Este projeto permitirá que se faça avaliação do desenvolvimento de um produto cárneo com alto valor nutricional agregado, com apelo funcional e que usa as alternativas locais. Além disso, estudar a estabilidade oxidativa dos produtos cárneos como hambúrgueres, frente ao extrato de pólen apícola, manjerona e manjericão como antioxidante natural em substituição aos antioxidantes sintéticos.

O presente termo será entregue em duas vias, sendo que uma delas poderá permanecer consigo. **Esclarecemos também, que não pagaremos e nem receberemos nada de sua pessoa para fazer esta análise e responder o questionário sobre ela.** Será mantida a confidencialidade de sua participação e os seus dados serão utilizados somente para fins científicos. Poderá cancelar sua participação a qualquer momento, e, caso necessite de maiores informações o telefone do comitê de ética é: (45) 32203272.

Declaro estar ciente do exposto e desejo participar do projeto

Pato Branco/PR, ____/____/____.

 Nome

 Assinatura

Nós, Solange Teresinha Carpes e Leila Fernanda Serafini, declaramos que fornecemos todas as informações do projeto ao participante.