

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

O USO DE EXTRATOS VEGETAIS PARA INIBIR A OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM
CARNE SUÍNA

Renata Toniolo

Porto Alegre

2012/2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

O USO DE EXTRATOS VEGETAIS PARA INIBIR A OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM
CARNE SUÍNA

Renata Toniolo

Monografia apresentada ao Curso
de Engenharia de Alimentos para
obtenção do título de Engenheiro de
Alimentos.

Orientadora: Florencia Cladera
Olivera

Co-orientadora: Roberta Cruz
Silveira Thys

Porto Alegre

2012/2

O USO DE EXTRATOS VEGETAIS PARA INIBIR A OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM
CARNE SUÍNA

Renata Toniolo

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

.....
Florença Cladera Olivera (Orientadora)

Doutora em Engenharia Química

UFRGS

.....
Plinho Francisco Hertz

Doutor em Ciência de Alimentos

UFRGS

.....
Adriano Brandelli

Doutor em Ciências Químicas

UFRGS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 JUSTIFICATIVA	8
3 OBJETIVOS	9
3.1 Objetivo Geral.....	9
3.2 Objetivos Específicos.....	9
4 DESENVOLVIMENTO BIBLIOGRÁFICO	10
4.1 Oxidação de gorduras.....	10
4.1.1 <i>Mecanismo de reação</i>	10
4.1.1.1 Fase de indução ou iniciação.....	10
4.1.1.2 Fase de propagação.....	11
4.1.1.3 Fase de terminação	12
4.1.2 <i>Efeitos catalíticos ou pró-oxidantes</i>	13
4.2 Antioxidantes	15
4.2.1 <i>Definições</i>	15
4.2.2 <i>Tipos de antioxidantes</i>	15
4.2.3 <i>Antioxidantes utilizados em alimentos</i>	17
4.2.4 <i>Aspectos toxicológicos</i>	18
4.3 Extratos vegetais	19
5 ARTIGO.....	22
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

LISTA DE TABELAS

Table 1. Concentration of phenolic compounds from different vegetable extracts evaluated by Folin-Ciocalteu method (expressed in catechol and galic acid)	34
Table 2. Antioxidant activity from different vegetable extracts evaluated by DPPH method (expressed in percentage of inhibition).....	35
Table 3. Antioxidant activity of extracts evaluated by TBARS test with olive oil.....	36
Table 4. Application of vegetable extracts in pork meat to inhibit lipid oxidation (the efficiency was verified by TBARS).....	37

LISTA DE FIGURAS

DESENVOLVIMENTO BIBLIOGRÁFICO

- Figura 1.** Influência da atividade de água na velocidade relativa de reações e de crescimento de microrganismos (Fonte: JAY, 2005)..... 14
- Figura 2.** Estrutura molecular do PG, TBHQ, BHA, e BHT..... 16

ARTIGO

- Figure 1.** Percentage of lipid oxidation inhibition with extracts without dilution.38
- Figure 2.** Percentage of lipid oxidation inhibition with extracts diluted 5 times.39
- Figure 3.** Percentage of lipid oxidation inhibition with extracts diluted 10 times.....40
- Figure 4.** Percentage of lipid oxidation inhibition with extracts diluted 20 times.....41

RESUMO

A oxidação lipídica é o principal fator não microbiano responsável pela deterioração de produtos cárneos. Esta reação é um sério problema, pois causa modificações na cor, aroma, textura, *flavor* e na qualidade nutricional do produto. Com o objetivo de inibir o desenvolvimento de reações oxidativas em produtos cárneos, os antioxidantes sintéticos têm sido utilizados na indústria da carne ao longo do tempo. Devido ao fato de antioxidantes sintéticos em alguns estudos apresentarem um potencial carcinogênico em animais, houve uma crescente preocupação com seu uso em alimentos. Uma alternativa é o uso de antioxidantes naturais, provenientes de plantas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar extratos aquosos de chá verde, alecrim, erva-mate, louro, sementes de uva, bagaço de uva, orégano, manjerona e pimenta preta quanto à quantidade de compostos fenólicos e sua atividade antioxidante, além da capacidade de inibir a oxidação lipídica de carne suína. Foram testadas 4 diluições diferentes de extrato (sem diluir, diluído 5 vezes, 10 vezes e 20 vezes). Os resultados demonstraram que os extratos que apresentaram uma maior quantidade de compostos fenólicos, também apresentaram um maior potencial. Além disso, nos testes *in vitro*, todos os extratos sem diluição apresentaram uma capacidade de inibição da oxidação lipídica superior a 95%. Nota-se então o potencial uso destes extratos como eficazes antioxidantes naturais, podendo ser uma alternativa para antioxidantes sintéticos, a fim de melhorar a qualidade e vida de prateleira de produtos cárneos. Para o futuro, sugere-se um estudo quanto às características sensoriais destes extratos em produtos cárneos, além de sua viabilidade econômica.

Palavras-chave: oxidação lipídica, extratos vegetais, antioxidantes, carne suína.

1 INTRODUÇÃO

A constante preocupação com a saúde aumentou a demanda por produtos naturais e livres de aditivos. Dentre os aditivos amplamente usados para manter a qualidade dos produtos, encontram-se os antioxidantes sintéticos.

Em carnes, a oxidação lipídica inicia-se logo após o abate. Este processo afeta a qualidade do produto com perdas de cor, sabor e odor, o que causa o encurtamento da vida de prateleira. Como consequência, estas reações podem acabar provocando devoluções de mercadorias, com sérios prejuízos aos fabricantes. A fim de inibir o desenvolvimento de reações oxidativas em produtos cárneos, antioxidantes sintéticos como BHA e BHT têm sido utilizados na indústria da carne ao longo do tempo.

No entanto, o uso destes antioxidantes em alimentos está sendo cada vez mais restrito devido ao fato de estudos toxicológicos terem demonstrado a possibilidade destes compostos provocarem efeitos carcinogênicos em animais. Como consequência, os antioxidantes naturais, provenientes de plantas, frutas, ervas e até mesmo de cascas e resíduos agroindustriais, surgem como alternativa ao uso dos antioxidantes sintéticos.

2 JUSTIFICATIVA

A carne suína é o tipo de carne mais utilizado para a fabricação de embutidos, linguiças e produtos cárneos em geral. Estes produtos são susceptíveis a oxidação lipídica, já que são ricos em gordura, e, devido a isto, costumam levar em sua composição antioxidantes sintéticos.

Nos últimos anos, houve uma crescente preocupação com o uso de antioxidantes sintéticos em alimentos. Por este motivo, a busca por outro tipo de antioxidantes que possam ser aplicados em alimentos vem crescendo, sendo uma alternativa o uso de antioxidantes naturais, provenientes de extratos vegetais.

Neste trabalho, extratos aquosos de chá-verde, alecrim, erva mate, louro, semente de uva, bagaço de uva, orégano, manjerona e pimenta preta foram avaliados quanto a sua capacidade antioxidante em carne suína.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi aplicar diversos extratos vegetais em carne suína para evitar a rancidez oxidativa.

3.2 Objetivos Específicos

Realizar uma revisão bibliográfica sobre o uso de antioxidantes em alimentos.

Obter extratos aquosos de chá-verde, alecrim, erva mate, louro, semente de uva, bagaço de uva, orégano manjerona e pimenta preta.

Avaliar a atividade antioxidante dos extratos obtidos.

Aplicar os extratos em carne suína para evitar a oxidação das gorduras.

Comparar os resultados obtidos entre os diferentes extratos.

4 DESENVOLVIMENTO BIBLIOGRÁFICO

Durante o seu processamento e armazenamento, os alimentos gordurosos podem sofrer transformações químicas, dentre as quais, uma das mais importantes é a rancidez oxidativa. Esta transformação é capaz de afetar profundamente a qualidade organoléptica do produto, influenciando sua aceitação pelo consumidor.

4.1 Oxidação de gorduras

“Oxidação lipídica” é o termo geral utilizado para descrever uma sequência de alterações químicas oriundas da interação entre os lipídeos e o oxigênio (DAMODARAM et al, 2010). Esta reação é um sério problema, pois causa modificações na cor, aroma, textura, *flavor* e até mesmo na qualidade nutricional do produto (FERNANDEZ et al., 1997). Além disso, é o principal fator não microbiano responsável pela deterioração de produtos cárneos (PRADHAN et al., 2000).

4.1.1 Mecanismo de reação

A oxidação lipídica acontece em três etapas diferentes, distinguíveis pelas características organolépticas e pelos produtos formados em cada fase. Estas etapas são descritas na continuação.

4.1.1.1 Fase de indução ou iniciação

Ocorre quando um átomo de hidrogênio é removido do grupo metileno de um ácido graxo insaturado. Esta reação leva à formação de um radical livre (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007), conforme a seguinte reação:



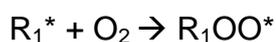
Onde: R_1H – é um ácido graxo insaturado e R_1^* - é um radical livre.

Para que a reação de oxidação ocorra é necessária a presença de oxigênio e de uma certa energia inicial (COULTATE, 2004). A formação dos primeiros radicais livres poderia ser explicada pela ação de pró-oxidantes por interação direta com ácidos graxos insaturados para a formação de hidroperóxidos lipídicos ou para a promoção de radicais livres (por exemplo, cátions metálicos e radiação UV) (DAMODARAM et al, 2010). A reação também pode ser iniciada através do ataque do oxigênio singlete (1O_2), uma forma especial de oxigênio muito reativo. Este tipo de oxigênio é proveniente do oxigênio no estado fundamental, de baixa energia, o oxigênio tripleto (3O_2) através de inúmeras reações com heme e luz ou com pigmentos como a clorofila e a riboflavina (COULTATE, 2004).

São características desta fase: baixo consumo de oxigênio; baixa concentração de peróxidos; aumento na concentração de radicais livres e ausência de alterações organolépticas (BOBBIO e BOBBIO,1995).

4.1.1.2 Fase de propagação

Uma vez formado o radical livre, este reage com o oxigênio atmosférico para gerar um radical peróxido. Estes radicais também são extremamente reativos e seguem reagindo com outros ácidos graxos insaturados, produzindo hidroperóxidos e outro radical livre. Este pode então prosseguir e repetir o processo, caracterizando esta sequência de fatos como uma reação em cadeia de radicais livres (COULTATE, 2004). O mecanismo de ação é mostrado a seguir:



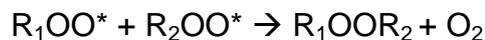
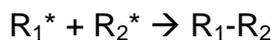
Onde: R_1^* e R_2^* - são radicais livres, R_2H – é um ácido graxo insaturado, R_1OO^* - é um radical peróxido e R_1OOH – é um hidroperóxido.

Pelo fato de serem muito instáveis, os hidroperóxidos se decompõem, gerando uma variedade de aldeídos, álcoois e cetonas, dentro dos quais estão os agentes indesejáveis de sabor e odor (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007).

São características desta fase: alto consumo de oxigênio; a concentração de peróxidos cresce rapidamente enquanto que a decomposição destes se inicia; início das alterações organolépticas com aparecimento de odor (BOBBIO e BOBBIO,1995).

4.1.1.3 Fase de terminação

A reação de terminação ocorre quando dois radicais livres interagem entre si, formando produtos estáveis, terminando assim o papel deles como propagadores da reação (ARAÚJO, 2011). As reações que ocorrem na fase de terminação estão descritas abaixo:



Onde: R_1^* e R_2^* - são radicais livres, R_1OO^* e R_2OO^* - são radicais peróxido, R_1OOR_2 e R_1-R_2 – são produtos estáveis.

São características desta fase: decréscimo no consumo de oxigênio e na concentração de peróxidos; presença de forte alteração organoléptica caracterizada por cheiro e sabores fortes, alterações na viscosidade e na cor, bem como na sua composição (BOBBIO e BOBBIO,1995).

4.1.2 Efeitos catalíticos ou pró-oxidantes

As reações de oxidação podem ser influenciadas por vários fatores, dentre eles: temperatura, luz, oxigênio, metais de transição, atividade de água. A seguir são apresentados os principais fatores.

Composição dos ácidos graxos: Quanto maior o número de ácidos graxos insaturados, maior é a velocidade de oxidação. Além disso, os ácidos graxos oxidam mais rapidamente quando livres do que na forma esterificada, pois estão mais acessíveis (ARAÚJO, 2011).

Concentração de oxigênio: quanto maior a concentração de oxigênio disponível, maior a velocidade de oxidação dos lipídeos (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007).

Temperatura: a velocidade da oxidação costuma ser maior com o aumento da temperatura. Temperaturas elevadas podem também causar degradação e volatilização de antioxidantes (DAMODARAM et al, 2010). A refrigeração ou congelamento não são capazes de paralisar a oxidação, pois, em baixas temperaturas, a solubilidade do oxigênio em solução aquosa aumenta (ARAÚJO, 2011).

Área superficial: quanto maior a área superficial, maior é a exposição ao oxigênio e a pró-oxidantes e, conseqüentemente, maior é a velocidade de oxidação (DAMODARAM et al,2010).

Atividade de água: em baixos teores de atividade de água, a velocidade de oxidação é alta, pois há um maior contato entre reagentes e substratos. Em valores intermediários de atividade de água ($a_w \leq 0,30$), a taxa de oxidação é reduzida devido ao efeito da diluição. Em valores elevados de atividade de água, a taxa de oxidação aumenta novamente, provavelmente em razão do aumento da atividade dos metais catalisadores (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007). A Figura 1 mostra a influência da atividade de água na velocidade relativa da reação de auto-oxidação lipídica, além de outras reações.

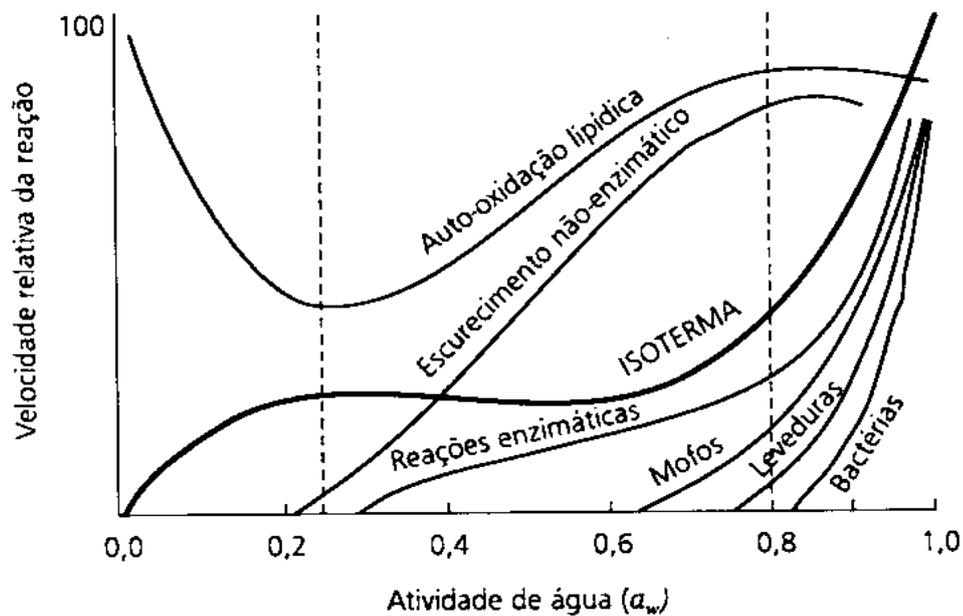
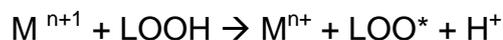
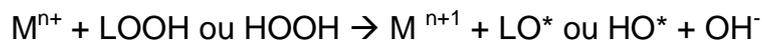


Figura 1. Influência da atividade de água na velocidade relativa de reações e de crescimento de microrganismos (Fonte: JAY, 2005).

Metais: íons metálicos de transição são promotores da formação de radicais livres, atuam na redução da energia de ativação inicial da reação de oxidação e na decomposição de peróxidos (DAMODARAM et al, 2010). Quantidades-traço de metais são naturalmente encontradas em alimentos ou podem ser oriundas de equipamentos utilizados no processamento e armazenamento destes produtos (ARAÚJO, 2011). Abaixo pode-se ver o mecanismo de ação dos íons metálicos.



Onde, M^{n+} e M^{n+1} são metais de transição em seu estado reduzido e oxidado; LOOH e HOOH são peróxidos de lipídeo e hidrogênio; e LO^* , HO^* e LOO^* são radicais alcooxil, hidroxil e peroxil, respectivamente.

Outros fatores como radiação ultravioleta, mioglobina e pigmentos como a clorofila, catalisam a reação de oxidação (DAMODARAM et al, 2010). Além disso, quando a concentração de pró-oxidantes for muito alta em um determinado alimento, o período de indução pode não existir (BELITZ e GROSCH, 1986), fazendo com que a oxidação se dê de forma mais rápida.

4.2 Antioxidantes

Mesmo que a inibição completa da rancificação oxidativa não seja possível, pode-se retardar esta reação por longos períodos, através da ação de meios físicos e/ou químicos. Os meios físicos são representados pelas embalagens que não permitem a passagem de luz, que contenham pouco ar e o uso de temperaturas adequadas de armazenamento. Já os meios químicos são representados pelo uso dos compostos antioxidantes e pela eliminação de metais e pigmentos fotossensíveis (BOBBIO e BOBBIO,1995).

4.2.1 Definições

Segundo o *Codex Alimentarius*, antioxidante é um aditivo alimentar, que prolonga a vida de prateleira de alimentos através da proteção contra a deterioração causada pela oxidação. A Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997 da ANVISA (BRASIL, 1997), define antioxidante como um aditivo que retarda o aparecimento de alteração oxidativa no alimento. Do ponto de vista químico, os antioxidantes são compostos aromáticos, podendo ser naturais ou sintéticos (ARAÚJO, 2011).

4.2.2 Tipos de antioxidantes

Os mecanismos antioxidantes dos compostos usados para o controle da oxidação lipídica incluem: o controle de radicais livres, onde agentes sequestrantes de radicais livres reagem mais rapidamente com estes radicais em comparação com os ácidos graxos insaturados; o controle de pró-oxidantes, pela ação de agentes quelantes ou complexantes de metais de transição, e pela ação de carotenóides sobre o oxigênio singlete (DAMODARAM et al, 2010).

Os antioxidantes primários incluem os compostos fenólicos e fenóis. Eles atuam bloqueando a ação de radicais livres através da doação de elétrons ou hidrogênio, transformando estes radicais em produtos “estáveis”. Os antioxidantes sinérgicos, de forma genérica, são classificados como complexantes e removedores de oxigênio. Os sinérgicos ainda podem atuar regenerando o antioxidante primário. São exemplos de removedores de oxigênio o ácido ascórbico, o ácido eritórbito e o palmitato de ascorbilo e exemplos de agentes complexantes, o ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA), a lecitina, o ácido cítrico e citrato, ácido fosfórico e fosfatos e ácido tartárico (ARAÚJO, 2011).

Os antioxidantes podem também ser classificados como naturais e sintéticos. LAGUERRE et al. (2007) descreveram que os antioxidantes exógenos, especialmente fornecidos por alimentos, são essenciais para evitar o estresse oxidativo. Estes antioxidantes são oriundos principalmente de plantas sob a forma de compostos fenólicos. Os antioxidantes sintéticos também possuem uma estrutura fenólica e os mais utilizados em alimentos são o hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), butil hidroxiquinona terciária (TBHQ) e o galato de propila (GP) (MULTON, 1999). Na Figura 2 pode-se ver a estrutura molecular destes antioxidantes.

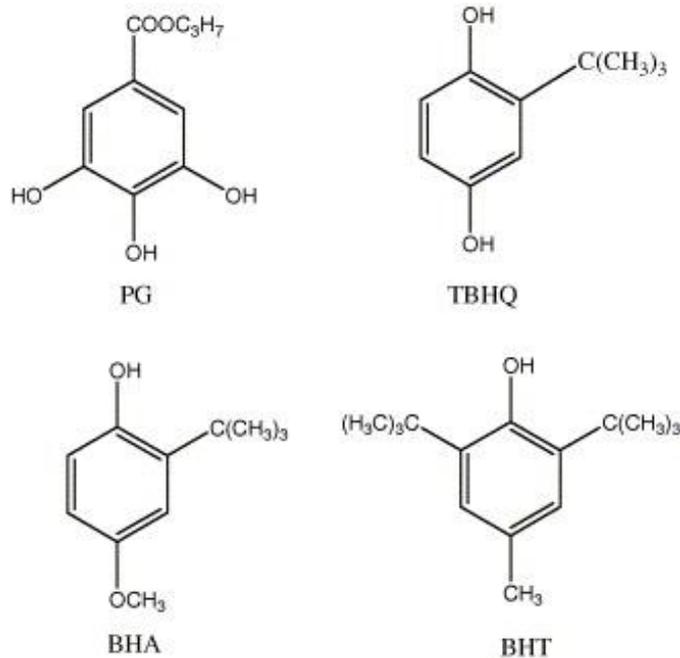


Figura 2. Estrutura molecular do PG, TBHQ, BHA, e BHT (Fonte: DAMODARAM et al, 2010).

4.2.3 Antioxidantes utilizados em alimentos

Os antioxidantes mais utilizados na indústria de alimentos são: BHA, BHT, TBHQ, Galato de Propila e Palmitato de Ascorbila. Na continuação serão abordadas algumas características destes aditivos.

BHA (hidroxianisol butilado): É um antioxidante sintético solúvel em óleos e gorduras (MULTON, 1999). Em óleos vegetais, apresenta pouca atividade antioxidante. Sua eficiência é perdida quando aquecido na presença de água. Além disso, apresenta um maior efeito quando usado em combinação com BHT e galato de propila (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007).

BHT (hidroxitolueno butilado): É o antioxidante mais ativo em gorduras animais (BOBBIO e BOBBIO,1995) e apresenta as mesmas características que o BHA (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007).

TBHQ (butil hidroxiquinona terciária): É muito efetivo na estabilização de óleos e gorduras e sua atividade é equivalente ou maior que a do BHT, BHA ou GP (ARAÚJO, 2011).

Galato de Propila (PG): É um antioxidante que sob “stress” térmico e em meio básico, perde sua eficiência. Além disso, ele forma compostos escuros com íons metálicos (MULTON, 1999). É pouco solúvel em água e óleos e muito solúvel em compostos orgânicos (BOBBIO e BOBBIO,1995).

Palmitato de ascorbila: É um composto sintético obtido a partir de ácidos naturais: o ascórbico e o palmítico. Seu mecanismo de ação ainda não é conhecido (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007). É pouco solúvel em óleos (MULTON, 1999).

Os antioxidantes naturais mais usados em alimentos são: ácido ascórbico, ácido cítrico, tocoferóis. Abaixo se encontram algumas características destes.

Ácido ascórbico: Atua de diversas formas, por exemplo, como removedor de oxigênio e sinergicamente com agentes complexantes. É utilizado nos mais variados produtos, como peixe, carne e derivados do leite (ARAÚJO, 2011).

Ácido cítrico: É muito utilizado na indústria como complexante e acidificante, sendo incorporado na maioria das formulações de antioxidantes comerciais (ARAÚJO, 2011).

Tocoferóis: São os principais antioxidantes naturais encontrados em vegetais e gordura animal. Possuem várias formas e todas elas possuem atividade de vitamina E (ARAÚJO, 2011). O α -tocoferol, o mais abundante entre todas as formas, é insolúvel em água e solúvel em óleos vegetais e gorduras animais (BOBBIO e BOBBIO, 1995).

4.2.4 Aspectos toxicológicos

Com base em estudos toxicológicos, o JECFA (*Joint WHO/FAO Expert Committee for Food Additives*) estabeleceu a Ingestão Diária Aceitável (IDA) dos aditivos. A IDA representa a quantidade estimada de um determinado aditivo alimentar, expressa em miligrama por quilo de peso corpóreo (mg/kg p.c.), que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem oferecer risco apreciável à saúde (WHO, 1987).

O IARC (*International Agency for Research on Cancer*) é uma agência intergovernamental que faz parte da Organização Mundial da Saúde das Nações Unidas. O IARC classifica as substâncias como: 1 – Cancerígeno para humanos; 2A – Provavelmente cancerígeno para humanos; 2B – Possivelmente cancerígeno para humanos; 3 – Não classificado como cancerígeno para humanos; 4 - Provavelmente não cancerígeno para humanos. Segundo esta classificação, o BHA é classificado como 2B e o BHT como 3 (IARC, 2012).

A Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998 da ANVISA (BRASIL, 1998) estabelece que, para produtos cárneos, é permitida a adição de, no máximo, 0,01% para os antioxidantes PG, BHA e BHT em relação ao teor de gordura do alimento. A mistura de aditivos com igual função é permitida sempre que a soma de todos os limites não seja superior ao limite máximo de nenhum deles.

Segundo POKORNÝ (2007), os limites de segurança dos antioxidantes naturais na sua maioria não são conhecidos, porém, sabe-se que são mais seguros

que os antioxidantes sintéticos. Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade dos antioxidantes provocarem efeitos carcinogênicos em animais. Um estudo realizado por HIROSE et al. (1986) revelou que o BHA mostrou-se capaz de induzir a hiperplasia gastrintestinal em roedores F344. O mecanismo de ação do BHA no epitélio gastrintestinal ainda é desconhecido. No entanto, parece provável que o BHA por si mesmo ou seus metabólitos formados no estômago ajam diretamente sobre o epitélio para induzir lesões gastrintestinais (ITO et al., 1986).

Os efeitos do tratamento de carcinogênese induzida com administração concomitante entre antioxidantes com N, N-dibutilnitrosamina (DBN) foram investigados por IMAIDA et al. (1988). Ratos F344 machos receberam 0,05% de DBN em água e, simultaneamente, foram administradas dietas contendo 2,0% BHA, ou 0,7% de BHT, durante 16 semanas. Como resultado, ficou demonstrado que o tratamento concomitante de DBN com BHA ou BHT aumenta fortemente a indução de tumores do fígado. Outro estudo mostrou que o BHA administrado em ratos aumentou a incidência de tumores pulmonares induzidos pela N-nitrosopirrolidina (CHUNG et al., 1986).

Por outro lado, outros estudos demonstram o contrário. O BHT administrado em ratos com agentes carcinogênicos conhecidos não apresentou efeitos sobre a carcinogenicidade. BHA foi testado *in vitro* em células de *Salmonella typhimurium*, *Drosophila melanogaster* e em hamster chinês e também não apresentou mutagenicidade nessas células. Apesar disso, há *suficiente evidência* para a carcinogenicidade do BHA e uma *limitada evidência* para o BHT em experimentos com animais. Não há dados disponíveis sobre a carcinogenicidade do BHA e do BHT em humanos (IARC, 1998).

Em virtude destes motivos, o uso de antioxidantes sintéticos em alimentos está sendo cada vez mais restrito.

4.3 Extratos vegetais

Atualmente, a busca por uma alimentação saudável fez com que a demanda por ingredientes naturais crescesse, fazendo com que os extratos estivessem cada

vez mais em foco (EXTRATOS VEGETAIS, 2010). Sinônimos de naturais, os extratos vegetais são encontrados nos mais diversos tipos de cosméticos, farmacêuticos e alimentícios.

De acordo com POKORNY (1991), quando comparados com os antioxidantes sintéticos, os antioxidantes naturais têm as seguintes vantagens: são facilmente aceitáveis pelos consumidores, são considerados seguros; antioxidante natural (não como um antioxidante químico sintético) é idêntico ao alimento que pessoas consumiram por mais de cem anos ou que tenham misturados com outros alimentos; este antioxidante não só estabiliza os óleos comestíveis como também aumenta o valor nutracêutico do óleo.

Nos últimos anos, vários estudos sobre o potencial antioxidante de extratos vegetais foram realizados. A atividade antioxidante de um total de 92 extratos oriundos de vegetais comestíveis e não comestíveis (bagas, frutas, legumes, ervas, cereais, materiais de árvores, brotos de plantas e sementes) foi examinada por KÄHKÖNEN et al. (1999). Extratos de maçã, de casca de batata e de casca de beterraba destacaram-se neste estudo por apresentarem fortes efeitos antioxidantes.

PÉREZ et al. (2011) confirmam a importância dos extratos de sálvia e orégano como fontes de antioxidantes naturais, além da capacidade de capturar radicais livres. Vários pesquisadores têm mostrado o potencial antioxidante de extratos de ervas, como a pimenta preta (AGBOR et al., 2006) e de subprodutos da indústria, como o bagaço de uva (PAZOS et al., 2005).

A atividade antioxidante de extrato de chá verde dechlorofilizado (DGTE) foi testada em óleos marinhos e comparada com os efeitos dos antioxidantes comumente utilizados BHA, BHT e TBHQ a 200 ppm e α -tocoferol a 500 ppm. DGTE a uma concentração ≥ 200 ppm exibiu uma atividade antioxidante excelente nos óleos e a sua eficácia foi mais elevada do que a do BHA, BHT e do α -tocoferol, porém menos elevada do que a do TBHQ (WANASUNDARA e SHAHIDI, 1998).

Um estudo realizado por SEBRANEK et al. (2005) mostrou que o extrato de alecrim, aplicado a 2500 ppm, foi tão eficaz como as concentrações máximas permitidas de BHA / BHT quando aplicados em linguiça de porco fresca e em salsicha cozida congelada, e, além disso, mostrou-se superior ao BHA / BHT em hambúrguer cru congelado de carne de porco. Outras pesquisas indicaram que o

extrato de alecrim pode retardar a oxidação lipídica e prolongar a vida de prateleira de produtos cárneos (GEORGANTELIS et al., 2007; MIELNIK et al., 2008).

Estudos avaliando a atividade de extratos vegetais em carnes foram realizados, comprovando o efeito antioxidante deles, como por exemplo: o uso de extrato de resíduo de uva em carne de frango crua e cozida (SELANI et al., 2011); a adição de orégano, sálvia e mel antes do processamento de carne de frango cozida e refrigerada (SAMPAIO et al., 2012); o uso de extratos de folhas de curry e hortelã em carne crua de porco refrigerada (BISWAS et al., 2012).

5 ARTIGO

Artigo a ser submetido à revista *Meat Science*, já formatado nas normas para envio à revista.

Use of vegetables extracts to inhibit lipid oxidation in pork

Renata Toniolo¹, Roberta Cruz Silveira Thys¹, Adriano Brandelli¹, Florencia Cladera-Olivera^{1*}

¹ Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (ICTA-UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author: Florencia Cladera-Olivera Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (ICTA-UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +5551 3308 9849; fax: +5551 3308 7048; e-mail: florencia.cladera@ufrgs.br

Abstract

Lipid oxidation is a major cause for the deterioration of meat products. To reduce it, synthetic antioxidants have been commonly used in the food industry. However, due to their potential carcinogenic effects in animals, the use of synthetic antioxidants has been avoided and the demand for natural antioxidants has been increasing. The objective of this work was to investigate the antioxidant activity of aqueous extracts of green tea, rosemary, *Ilex paraguariensis*, laurus, grape seeds, grape marc, oregano, marjoram and black pepper and their application to inhibit lipid oxidation in pork. The phenolic compounds content was determined and the antioxidant activity was evaluated by the DPPH scavenging method. The results showed that extracts showing an higher amount of phenolic compounds, also presented a higher antioxidant potential. Almost all extract tested, even when diluted twenty times, were able to inhibit lipid oxidation in pork. The results from this research demonstrate that aqueous extracts of green tea, rosemary, *Ilex paraguariensis*, laurus, grape seeds,

grape marc, oregano, marjoram and black pepper can be considered a source of natural antioxidants for food industry.

Keywords: vegetables extracts, antioxidants, meat, pork, lipid oxidation.

1. Introduction

Lipid oxidation is the main non-microbial factor responsible for the deterioration of *meat* products (Pradhan et al., 2000). This mechanism involves the oxidation of unsaturated fatty acids (Damodaran et al., 2010). This is a serious problem because it not only changes the color, aroma, texture and flavor but also decreases the nutritional quality and safety of the food (Fernandez et al., 1997; Frankel, 1980; Shih & Daigle, 2003).

To overcome this problem, artificial ingredients such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), butylated hydroxyl anisole (BHA) and butylated hydroxyl toluene (BHT) have been commonly used in food industry (Brannan & Mah, 2007). However, since some synthetic antioxidants have been documented to exhibit carcinogenic effects in animals (Chung et al., 1986; Hirose et al., 1986; Imaida et al., 1988; Ito et al., 1986), the consumer awareness and health consciousness have been increased to avoid the use of synthetic additives (Georgantelis et al., 2007).

Some studies have confirmed that exogenic antioxidants, especially provided by foods, are essential to prevent oxidative stress (Laguette et al., 2007). These antioxidants mainly come from plants in the form of phenolic. As antioxidants, the polyphenols can protect cell constituents against oxidative damage. In foods, phenolic compounds are also associated with the nutritional and sensory quality, contributing to aroma and taste (Imeh & Khokhar, 2002).

In this work, vegetable extracts were used to inhibit lipid oxidation in pork. Several investigators have shown the antioxidant potentials of plants extracts, such as rosemary (Sebranek et al., 2005), green tea (Wanasundara & Shahidi, 1998), black pepper (Agbor et al., 2006) and byproducts of agroindustry, such as grape marc (Pazos et al., 2005). Other studies evaluating the activity of plant extracts have been proven in meats, for example: the use of wine industry residues in raw and cooked chicken meat (Selani et al., 2011); sage, oregano and honey in cooked chicken meat during refrigeration (Sampaio et al., 2012); curry and mint leaf extracts in raw ground pork meat during refrigeration (Biswas et al., 2012).

The aim of this work was to investigate the antioxidant activity of aqueous extracts of green tea, rosemary, *Ilex paraguariensis*, laurus, grape seeds, grape marc, oregano, marjoram and black pepper and their application to inhibit lipid oxidation in pork.

2. Materials and methods

2.1 Vegetables extracts

The vegetables were purchased at a local market (Porto Alegre, Brazil). The leaves and seeds were ground in a mill. The aqueous extracts of these vegetables were obtained by placing 15 g of each powdered product with 100mL of water for 60 min in water bath at 50°C with agitation at 100 rpm. The material was filtered through vacuum filtration and the filtrate was regarded as the extract. The extracts were frozen and stored at -18°C until use.

2.2 Extracts characterization

2.2.1 Determination of phenolic compounds

Phenolic compounds were determined by the Folin-Ciocalteu method modified by Brandelli and Lopes (2005). The results were expressed in mg of catechol equivalent per mL of extract and in mg of galic acid per mL of extract. The tests were performed in triplicate.

2.2.2 Determination of antioxidant activity by DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl)

The DPPH method used was described by Brand-Williams et al. (1995), based on the capture of the radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) antioxidants, producing a decrease in absorbance at 515 nm. The readings (515 nm) were monitored every minute, where was observed the reduction of absorbance to stabilize them. The tests were performed in triplicate. The capacity to scavenge the DPPH radical was calculated with the following equation:

$$scavenge\% = 100 \times \frac{(ABS_{control} - AB_{treated})}{ABS_{control}}$$

2.2.3 Determination of antioxidant activity by TBARS

The reaction to thiobarbituric acid (TBARS) was determined according to the method of Ohkawa et al. (1979) using olive oil. The standard curve was performed using malonaldehyde (MDA) in concentrations from 0 to 9 nM. The tests were performed in triplicate.

2.3 Inhibition of lipid oxidation in meat systems

The method used in this study for the assessment of lipid oxidation in meat was the thiobarbituric acid (TBA) test for malonaldehyde (MDA) determination. Antioxidant activity in meat was determined as described by Ohkawa et al. (1979). Pork was used in this experiment. Meat samples (20g) were homogenized in 100 mL of Tris HCl 0.1 mol L⁻¹ pH 7.0. The oxidation was activated using a solution of ferrous sulfate in tubes containing the extract of each vegetable and incubated in a water bath at 80°C for 120 min. After incubation, the mixture was tested for the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), by adding 8.1% sodium lauryl sulfate (SDS), acetic acid buffer pH 3.44 and 0.6% thiobarbituric acid (TBA) and incubated again at 80°C for 60 min. The reaction products were determined by measuring absorbance at 532 nm in a spectrophotometer. Samples with meat homogenate were centrifuged before being read on the spectrophotometer. The tests were performed in triplicate and controls were performed with water. The TBARS concentration was calculated using a standard curve and results were expressed in nmol L⁻¹ of malonaldehyde (MDA). The percentage of inhibition in lipid oxidation was calculated with the following equation:

$$\text{inhibition \%} = 100 \times \frac{(\text{control} - \text{treated})}{\text{control}}$$

2.4 Moisture and fat content of meat

The moisture content in meats was measured by weight loss at 105°C until a constant weight according AOAC (1984) and the fat content was determined using the Bligh-Dyer Method (Bligh & Dyer, 1959).

2.5 Statistical analysis

Results were compared using t-test or ANOVA and Tukey post-hoc test ($p \leq 0.05$). Statistical analysis of the data was performed using the Statistica 7.0 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) and plots using Microsoft Excel 2000 (MapInfo Corporation, Troy, NY, USA).

3. Results and discussion

Phenolic compounds are commonly found in plants and they have been reported to have multiple biological effects, including antioxidant activity (Kähkönen et al., 1999). The results show that the content of phenolic compounds in the extract of *Ilex paraguariensis* and oregano were the highest among all extracts, with no significant difference between them and with rosemary extract (Table 1). Furthermore, marjoram, green tea and laurel showed results higher than black pepper, grape seeds and grape marc. Aqueous extract of rosemary showed 2.80 mg galic acid/mL of extract. For oregano's extract, 3.05 mg galic acid/mL of extract was verified. A previous study verified that soluble extracts obtained from rosemary and oregano had 0.46 mg galic acid/mL and 2.57 mg galic acid/mL of extract, respectively. The conditions for extraction of phenolic compounds were 10g in 150mL (75% ethanol) during 8 hours of operation for rosemary and 10g in 200mL (40% ethanol) during 7.5 hours of operation for oregano (Santos et al., 2012).

The antioxidant activity of vegetable extracts was determined *in vitro* by two methods: DPPH and TBARS. The results for the first method showed that extracts from rosemary, *Ilex paraguariensis*, laurel, green tea, oregano and marjoram are able

to scavenge the DPPH radical, with no significant difference between them (Table 2). Extracts from black pepper, grape seeds and grape marc did not show DPPH scavenging activity. This result agrees with the phenolic content of extracts obtained. According to Parr & Bolwell (2000), phenolic compounds are the major determinant of antioxidant potential of foods and they are natural sources of antioxidants.

For the TBARS test with olive oil, it was verified that all extracts have not the ability to prevent the lipid oxidation in oil (Table 3). The majority of extracts presented no significant difference when compared with the controls, or even showed higher MDA values in relation to the controls. Furthermore, it was verified that when used extract diluted 5 times, the samples showed a smaller MDA values as compared with the samples tested with undiluted extract.

The antioxidant activity of aqueous extracts of green tea, rosemary, *Ilex paraguariensis*, laurus, grape seeds, grape marc, oregano, marjoram and black pepper was tested in meat systems. Four different concentrations of extracts (undiluted and diluted 5, 10 and 20 times) were added to pork (moisture = 71.45% w.b., fat = 9.08% w.b.) homogenates. Lipid oxidation was evaluated by measuring TBARS.

All extracts in all dilutions showed significant difference with the control (pork homogenate without extract). The exception was laurel extract diluted 10 and 20 times, which showed no significant difference with control (Table 4). All dilutions of marjoram extract were effective and presented no significant difference between them. The same was observed with samples of black pepper and grape marc. According to Balasundram, Sundram & Samman (2006), agro-industrial by-products are good sources of phenolic compounds, and have been explored as source of natural antioxidants. For example, extracts of Niagara and Isabel grape residue were

as effective as BHT and sodium erythorbate in preventing lipid oxidation in raw and cooked chicken meat (Selani et al., 2011).

Figure 1 shows the percentage of inhibition in lipid oxidation when vegetable extracts without dilution were incorporated to different pork homogenates. It was observed that all extracts tested presented over than 95% of inhibition in lipid oxidation (with no significant difference between them) in comparison with the controls. Similar results were observed with vegetable extracts diluted 5 times (Figure 2). In this case, only oregano's extract have significant difference with other extracts. The evaluating of antioxidant activity of plant extracts in meat has been studied and compared with synthetic antioxidants. Sebranek et al. (2005) showed that rosemary extract was as effective as the maximum permitted concentrations of BHA/BHT, when applied at 2500 ppm in refrigerated fresh and in cooked-frozen pork sausage. However, in raw-frozen pork sausage patties, it was superior to BHA/BHT.

When vegetable extracts diluted ten times (Figure 3) and twenty times (Figure 4) was tested it was observed the positive results in inhibition of lipid oxidation. This indicates that in some cases, even diluted, the concentrations of extracts are able to inhibit lipid oxidation. Sensorial tests must be performed to evaluate the influence of extracts on the flavor of the products.

4. Conclusion

The results from this research demonstrate the potential application of aqueous extracts of green tea, rosemary, *Ilex paraguariensis*, laurus, grape seeds, grape marc, oregano, marjoram and black pepper as effective natural antioxidants.

All of the extracts without dilution showed an ability to inhibit lipid oxidation more than 95%. Furthermore, the extracts that showed higher amount of phenolic compounds, also presented a higher antioxidant potential in capturing the DPPH radical. These natural plant extracts could offer to the food industries an alternative solution to synthetic antioxidants to improve quality and shelf-life of meat products.

5. Acknowledgments

This work received financial support from Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

6. References

- Agbor, G.A., Vinson, J.A., Obeng, J.E. & Ngogang, J.Y. (2006). Comparative analysis of the in vitro antioxidant activity of white and black pepper. *Nutrition Research*, 26(12), 659-663.
- Association of official analytical chemists (1984). Official Methods of Analysis. 14 ed. Washington, D.C. AOAC, 1141.
- Biswas, A.K., Chatli, M.K., Sahoo, J., (2012). Antioxidant potential of curry (*Murraya koenigii* L.) and mint (*Mentha spicata*) leaf extracts and their effect on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigeration storage. *Food Chemistry*, 133(2), 467-472.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Brannan, R.G., Mah, E. (2007). Grape seed extract inhibits lipid oxidation in muscle from different species during refrigerated and frozen storage and oxidation catalyzed by peroxynitrite and iron/ascorbate in a pyrogallol red model system. *Meat Science*, 77(4), 540-546.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 28, 25-30.
- Brandelli, A., Lopes, C.H.G.L. (2005). Polyphenoloxidase activity, browning potential and phenolic content of peaches during postharvest ripening. *Journal of Food Biochemistry*, 29, 624-637.
- Chung, F-L, Wang, M., Carmella, S.G., Hecht, S.S. (1986). Effects of Butylated Hydroxyanisole on the Tumorigenicity and Metabolism of *N*-Nitrosodimethylamine and *N*-Nitrosopyrrolidine in A/J Mice. *Cancer Research*, 46, 165-168.
- Damodaran, S.; Parkin, K. L.; Fennema O. R. *Fennema's Food Chemistry*, CRC Press, 2008.
- Fernandez, J., Perez-Alvarez, J. A., Fernandez-Lopez, J. A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59, 345-353.
- Frankel, E. N. (1980). Lipid oxidation. *Progress in Lipid Research*, 19, 1-22.
- Georgantelis, D., Blekas, G., Katikou, P., Ambrosiadis, I., Fletouris, D. J. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. *Meat Science*, 76(1), 172-181.
- Hirose, M., Hagiwara, A., Masui, T., Inoue, k., Ito, N. (1986). Combined effects of butylated hydroxyanisole and other antioxidants in induction of forestomach lesions in rats. *Cancer Letters*, 30(2), 169-174.
- Imaida, K., Fukushima, S., Inoue, K., Masui, T., Hirose, M., Ito, N. (1988). Modifying effects of concomitant treatment with butylated hydroxyanisole or butylated hydroxytoluene on N,N-dibutyl nitrosamine-induced liver, forestomach and urinary bladder carcinogenesis in F344 male rats. *Cancer Letters*, 43(3), 167-172
- Imeh, S., Khokhar, S. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6301–6306.
- Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T., Tatematsu M. (1986). Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 24 (10–11), 1071-1082.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-282.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358.

Pazos, M., Gallardo, J.M., Torres, J.L. & Medina, I. (2005). Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry*, 92, 547–557.

Parr, A. J., Bolwell, G. P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 985–1012.

Pradhan, A. A., Rhee, K. S., Hernandez, P. (2000). Stability of catalase and its potential role in lipid oxidation in meat. *Meat Science*, 54, 385-390.

Santos, R.D., Shetty, K., Cecchini, A.L., Miglioranza, L.H.S. (2012) Phenolic compounds and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extracts and its use in cheese spread. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33 (2), p. 655-666.

Sebranek, J.G., Sewalt V.J.H., Robbins, K.L. & Houser, T.A. (2005). Comparison of a natural rosemary extract and BHA/ BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Science*, 69(2), 289-296.

Selani, M.M., Contreras-Castillo, C.J, Shirahigue, L.D., Gallo, C.R., Plata-Oviedo, M. & Montes-Villanueva, N.D. (2011). Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. *Meat Science*, 88(3), 397-403.

Shih, F. F., & Daigle, K. W. (2003). Antioxidant properties of milledrice co-products and their effects on lipid oxidation in ground beef. *Journal of Food Science*, 68, 2672–2675.

Wanasundara, U.N., & Shahidi, F. (1998). Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, 63(3), 335-342.

Table 1. Concentration of phenolic compounds from different vegetable extracts evaluated by Folin-Ciocalteu method (expressed as catechol and gallic acid equivalents)

	mg catechol/mL	mg galic acid/mL
Rosemary	1.67±0.05 ^{a,d}	2.80±0.08 ^{a,d}
<i>Ilex paraguariensis</i>	1.84±0.03 ^d	3.08±0.05 ^d
Laurel	1.57±0.01 ^a	2.63±0.02 ^a
Green tea	1.59±0.00 ^a	2.67±0.00 ^a
Oregano	1.82±0.06 ^d	3.05±0.09 ^d
Marjoram	1.61±0.09 ^a	2.70±0.15 ^a
Black pepper	0.79±0.01 ^b	1.31±0.01 ^b
Grape seeds	0.78±0.07 ^b	1.29±0.12 ^b
Grape marc	0.80±0.03 ^b	1.33±0.05 ^b

The results represent the average of duplicates ± standard deviation. Different superscript letters in columns indicate significant differences ($p < 0.05$) by the Tukey test.

Table 2. Antioxidant activity from different vegetable extracts evaluated by DPPH method (expressed in percentage of inhibition).

	Inhibition (%)
Rosemary	78.18±0.14 ^b
<i>Ilex paraguariensis</i>	73.97±0.49 ^b
Laurel	79.64±0.37 ^b
Green tea	81.27±0.24 ^b
Oregano	83.54±0.14 ^b
Marjoram	81.35±0.14 ^b
Black pepper	0.00 ^c
Grape seeds	0.00 ^c
Grape marc	0.00 ^c

The results represent the average of triplicates ± standard deviation. Values are reference from extracts diluted 5 times. Different superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$) by the Tukey test.

Table 3. Antioxidant activity of extracts evaluated by TBARS test with olive oil.

	Concentration in nM of MDA	
	Control	Sample
Rosemary undiluted	1.28±0.04 ^a	2.73±0.02 ^b
Rosemary (1:5)*	1.28±0.04 ^a	1.17±0.20 ^a
<i>Ilex paraguariensis</i> undiluted	1.16±0.04 ^a	5.34±0.14 ^b
<i>Ilex paraguariensis</i> (1:5)*	1.75±0.45 ^a	1.60±0.18 ^a
Laurel undiluted	1.28±0.04 ^a	3.26±0.04 ^b
Laurel (1:5)*	1.28±0.04 ^a	2.15±0.67 ^a
Green tea undiluted	1.16±0.04 ^a	4.95±0.65 ^b
Green tea (1:5)*	1.75±0.45 ^a	2.22±0.12 ^a
Oregano undiluted	1.16±0.04 ^a	4.30±0.33 ^b
Oregano (1:5)*	1.75±0.45 ^a	1.67±0.07 ^a
Marjoram undiluted	1.16±0.04 ^a	4.63±0.34 ^b
Marjoram (1:5)*	1.75±0.45 ^a	1.63±0.12 ^a
Black pepper undiluted	1.16±0.04 ^a	3.43±0.25 ^a
Black pepper (1:5)*	1.75±0.45 ^a	1.47±0.13 ^a
Grape seeds undiluted	1.79±0.63 ^a	1.72±0.27 ^a
Grape seeds (1:5)*	1.79±0.63 ^a	2.18±0.90 ^a
Grape marc undiluted	1.28±0.04 ^a	1.40±0.01 ^a
Grape marc (1:5)*	1.28±0.04 ^a	1.17±0.17 ^b

*Dilution of five (1:5) times. The results represent the average of triplicates ± standard deviation. Different superscript letters indicate significant difference ($p < 0.05$) in the same line (Tukey test).

Table 4. Application of vegetable extracts in pork meat to inhibit lipid oxidation (the efficiency was verified by TBARS)

	Concentration in nM of MDA				
	Control	Undiluted	Dilution		
			1:5*	1:10*	1:20*
Rosemary	1.96±0.11 ^a	0.00±0.29 ^b	0.00±0.33 ^b	0.00±0.24 ^{b,c}	0.12±0.19 ^c
<i>Ilex paraguariensis</i>	2.29±0.47 ^a	0.00±0.15 ^b	0.00±0.53 ^b	0.24±0.10 ^c	0.50±0.06 ^c
Laurel	0.75±0.25 ^a	0.00±0.30 ^b	0.00±0.57 ^c	0.22±0.61 ^{a,b}	0.33±0.09 ^{a,b}
Green tea	1.70±0.53 ^a	0.00±0.41 ^b	0.00±0.08 ^b	0.00±0.22 ^b	0.00±0.89 ^c
Oregano	6.09±0.70 ^a	0.00±0.48 ^b	1.83±0.29 ^c	0.00±0.40 ^b	0.00±0.11 ^b
Marjoram	3.87±0.16 ^a	0.00±0.60 ^b	0.00±0.53 ^b	0.00±0.75 ^b	0.00±0.07 ^b
Black pepper	3.30±0.54 ^a	0.00±0.20 ^b	0.43±0.11 ^b	1.06±0.64 ^b	0.91±0.68 ^b
Grape seeds	4.62±0.64 ^a	0.17±0.45 ^b	0.38±0.38 ^b	3.01±0.54 ^c	2.17±0.35 ^c
Grape marc	1.94±0.67 ^a	0.00±0.65 ^b	0.00±0.55 ^b	0.38±0.20 ^b	0.51±0.18 ^b

*Dilution of five (1:5), ten (1:10) and twenty (1:20) times. The results represent the average of triplicates ± standard deviation. Different subscript letters indicate significant difference ($p < 0.05$) in the same line (Tukey test).

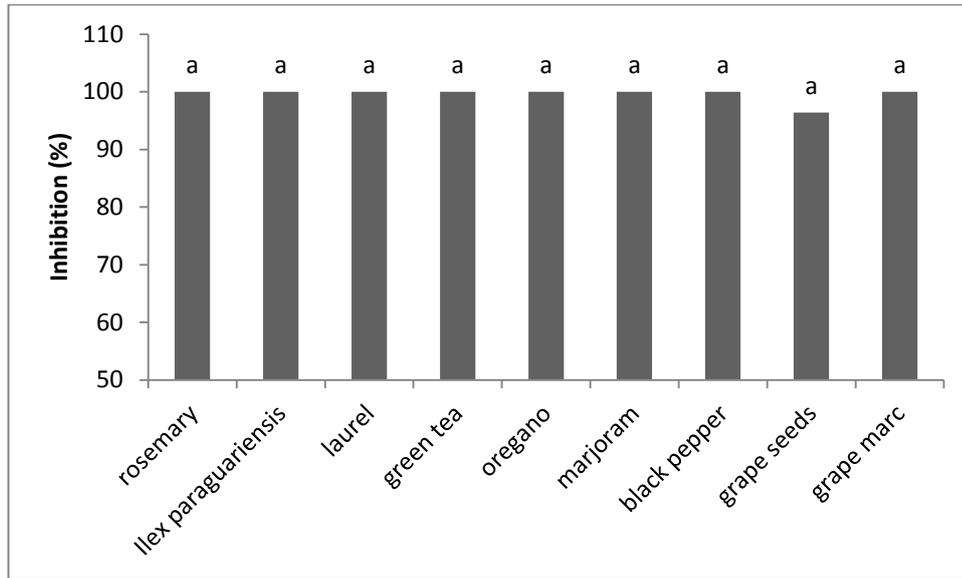


Figure 1. Percentage of lipid oxidation inhibition with extracts without dilution.

Different subscript letters indicate significant difference ($p < 0.05$) by Tukey test.

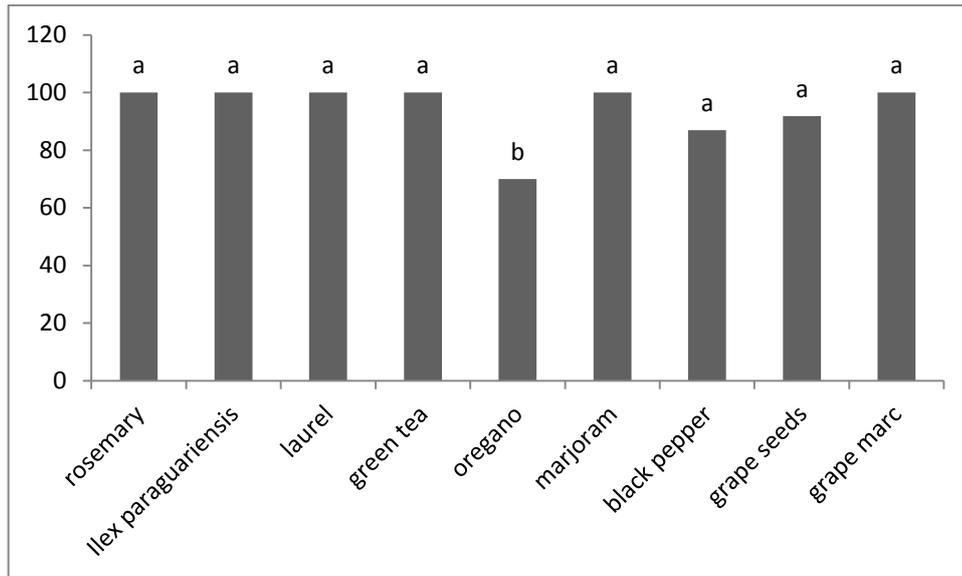


Figure 2. Percentage of lipid oxidation inhibition with extracts diluted 5 times.

Different subscript letters indicate significant difference ($p < 0.05$) by Tukey test

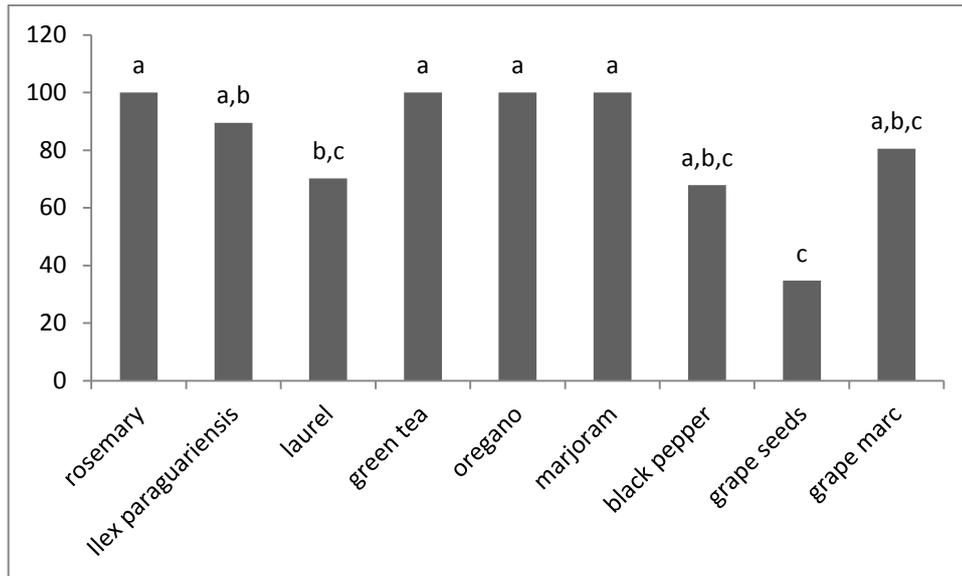


Figure 3. Percentage of lipid oxidation inhibition with extracts diluted 10 times.

Different subscript letters indicate significant difference ($p < 0.05$) by Tukey test

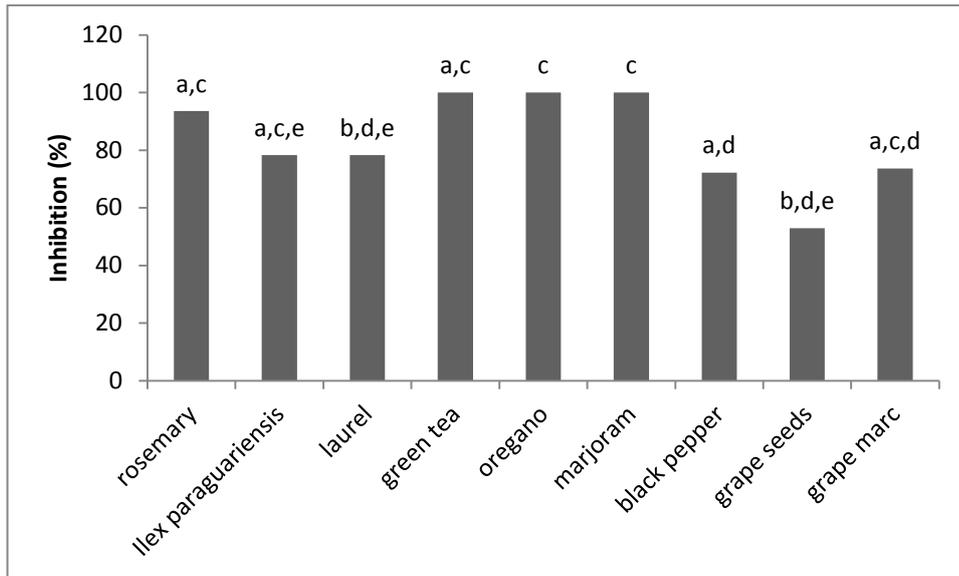


Figure 4. Percentage of lipid oxidation inhibition with extracts diluted 20 times.

Different subscript letters indicate significant difference ($p < 0.05$) by Tukey test.

6 CONCLUSÃO

Fatores como a preocupação com a saúde, a demanda por produtos naturais (livres de aditivos), o potencial carcinogênico de alguns antioxidantes, o reaproveitamento de subprodutos da indústria, a qualidade nutricional e a vida de prateleira dos produtos levaram ao estudo de novas fontes naturais de antioxidantes. Várias pesquisas foram desenvolvidas em torno deste assunto, utilizando materiais naturais como cascas, ervas, sementes e folhas.

O presente trabalho avaliou a capacidade de vários extratos vegetais em inibir a oxidação lipídica de carne suína. Os resultados demonstraram que os extratos que apresentaram uma maior quantidade de compostos fenólicos, também apresentaram um maior potencial antioxidante em capturar o radical DPPH. Além disso, nos testes *in vitro*, todos os extratos sem diluição apresentaram uma capacidade de inibição da oxidação lipídica superior a 95% em carne suína. Desta forma, nota-se a potencial aplicação de extratos aquosos de chá verde, alecrim, erva-mate, louro, sementes de uva, bagaço de uva, orégano, manjerona e pimenta preta como eficazes antioxidantes naturais. O potencial uso destes extratos naturais de plantas pode oferecer às indústrias de alimentos uma alternativa para antioxidantes sintéticos para melhorar a qualidade e vida de prateleira de produtos cárneos.

Para estudos futuros, propõem-se a aplicação destes extratos em produtos cárneos como, por exemplo, em linguiças, a fim de verificar qual o comportamento destes extratos em “meios heterogêneos”, além da percepção sensorial dos mesmos. Da mesma forma, sugere-se um estudo de viabilidade econômica destes extratos visando à produção em larga escala.

REFERÊNCIAS

- AGBOR, G.A. et al. Comparative analysis of the in vitro antioxidant activity of white and black pepper. **Nutrition Research**, v. 26, n. 12, p. 659-663, 2006.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5. ed. Viçosa : UFV, 2011.
- BELITZ, H-D; GROSCH, W. **Food chemistry**, Springer – Verlag, 1986.
- BISWAS, A.K.; CHATLI, M.K.; SAHOO, J. Antioxidant potential of curry (*Murraya koenigii* L.) and mint (*Mentha spicata*) leaf extracts and their effect on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigeration storage. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 467-472, 2012.
- BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 2. São Paulo: Varela, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997** - Aprova o Regulamento Técnico: "Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego". Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/540_97.htm>. Acesso em: 05/11/2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998** - Aprova o Regulamento Técnico: "Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos". Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1004_98.htm>. Acesso em: 05 nov 2012.
- CHUNG, F-L et al. Effects of Butylated Hydroxyanisole on the Tumorigenicity and Metabolism of *N*-Nitrosodimethylamine and *N*-Nitrosopyrrolidine in A/J Mice. **Cancer Res January**, v.46, p.165-168, 1986.
- CODEX ALIMENTARIUS. "**Class Names and the International Numbering System for Food Additives**." Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/7/CXG_036e.pdf>. Acesso em: 06 nov 2012.
- COULTATE, T.P.; Frazzon, J.; Soares, L.H.B.; Medina, L. F. C. Heck, J. X.; Brandelli, A. **Alimentos: a química de seus componentes**. 3. ed. Porto Alegre : Artmed, 2004. 368p.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p
- EXTRATOS VEGETAIS. **Revista Food Ingredients Brasil**, n. 11, 2010. Disponível em: < <http://www.revista-fi.com/materias/120.pdf> >. Acesso em: 26 out. 2012.
- FERNANDEZ, J.; PEREZ-ALVAREZ, J. A.; FERNANDEZ-LOPEZ, J. A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chemistry**, v. 59, p. 345-353, 1997.

GEORGANTELIS, D. et al. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. **Meat Science**, v. 76, n. 1, p. 172-181, 2007.

HIROSE, M. et al. Combined effects of butylated hydroxyanisole and other antioxidants in induction of forestomach lesions in rats. **Cancer Letters**, v.30, n.2, p.169-174, 1986.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), 2012. **Agents Classified by the IARC Monographs**, v.1–105. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>>. Acesso em: 05 nov 2012.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), 1998. **Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation**, v.40. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol40/volume40.pdf>>. Acesso em: 05 nov 2012.

IMAIDA, K. et al. Modifying effects of concomitant treatment with butylated hydroxyanisole or butylated hydroxytoluene on N,N-dibutyl nitrosamine-induced liver, forestomach and urinary bladder carcinogenesis in F344 male rats. **Cancer Letters**, v.43, n.3, p.167-172, 1988.

ITO, N. et al. Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v.24, n.10–11, p.1071-1082, 1986.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6.ed. Porto Alegre : Artmed, 2005. 711 p.

KÄHKÖNEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3954-3962, 1999.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, p. 244-282, 2007.

MIELNIK, M.B. et al. By-products from herbs essential oil production as ingredient in marinade for turkey thighs, LWT. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 93-100, 2008.

MULTON, J-L. **Aditivos y auxiliares de fabricacion en las industrias agroalimentarias**. 2.ed. Zaragoza : Acribia, 1999. 806p.

PAZOS, M. et al. Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. **Food Chemistry**, v. 92, p. 547–557, 2005.

PÉREZ, M.B.; BANEK, S.A.; CROCI, C.A. Retention of antioxidant activity in gamma irradiated argentinian sage and oregano. **Food Chemistry**, v.126, n. 1, p. 121-126, 2011.

PRADHAN, A. A.; RHEE, K. S.; HERNANDEZ, P. Stability of catalase and its potential role in lipid oxidation in meat. **Meat Science**, v. 54, p. 385-390, 2000.

POKORNÝ, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 2, p. 223–227, 1991.

POKORNÝ, J. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 629–642, 2007.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de Alimentos**. 2.ed. São Paulo: Editora Blucher, 2007.

SAMPAIO, G.R. et al. Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v.135, n. 3, p. 1383-1390, 2012.

SEBRANEK, J.G. et al. Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. **Meat Science**, v. 69, n. 2, p. 289-296, 2005.

SELANI, M.M. et al. Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. **Meat Science**, v. 88, n. 3, p.397-403, 2011

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Principles for the Safety Assessment of Food Additives and Contaminants in Food**, 1987. Geneva, (Switzerland): World Health Organization. Available from: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc70.htm>. Acesso em: 10 set 2012.