

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SHELF-LIFE DA GORDURA DE AVES COM DIFERENTES
NÍVEIS DE ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

Autora: Marianne de Alvarenga Boyd
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Scapinello

MARINGÁ
Estado do Paraná
Agosto - 2016

SHELF-LIFE DA GORDURA DE AVES COM DIFERENTES
NÍVEIS DE ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

Autora: Marianne de Alvarenga Boyd
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Scapinello

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal ou Nutrição de Animais de Companhia

MARINGÁ
Estado do Paraná
Agosto – 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

B789s Boyd, Marianne de Alvarenga, 1988-
Shelf-life da gordura de aves com diferentes
níveis de antioxidantes sintéticos / Marianne de
Alvarenga Boyd. -- Maringá, 2016.
xvii, 64 f. : figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos.
Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Scapinello.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, 2016.

1. Estabilizantes - Alimentos. 2. Gatos -
Alimentos. 3. Gordura de frango - Nutrição animal.
4. Oxidação - Palatabilidade - Alimentos. 5. Animais
de companhia - Alimentação. 6. Espectroscopia de
reflectância no Infravermelho Próximo (NIRS). I.
Vasconcellos, Ricardo Souza, orient. II. Scapinello,
Cláudio, coorient. III. Universidade Estadual de
Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 23.ed. 636.085

GVS-00003688



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**SHELF LIFE DA GORDURA DE AVES
COM DIFERENTES NÍVEIS DE
ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS**

Autora: Marianne de Alvarenga Boyd

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 24 de agosto de 2016.

Prof^a Dr^a Paula Toshimi
Matumoto Pinto

Prof^a Dr^a Ananda Portela Félix

Prof. Dr. Ricardo Souza
Vasconcellos
(Orientador)

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."

Louis Pasteur

À minha mãe, Cecília Gonçalves de Alvarenga

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Jesus Cristo, pela minha salvação, redenção e vida;

À minha mãe, Cecília Gonçalves de Alvarenga, pelo cuidado, ajuda e orações. Por todas as caronas até a Universidade, pela companhia no Gatil aos finais de semana e nos laboratórios, nos fins de tarde e noite. Por todo o incentivo, exemplo e força;

Aos meus avós, Eurico de Alvarenga e Iracy Gonçalves de Alvarenga, pelo incentivo e por acreditarem em mim. Pelas vezes que me acompanharam até o Gatil, por me emprestarem seus carros para que pudesse ir à FEI, pelos lanches da tarde após coletas e tratamentos na fazenda, pelas conversas;

Ao professor Dr. Ricardo Souza Vasconcellos, pela orientação, ensinamentos e amizade. Pela interminável paciência, pela ideia e oportunidade de realizar o experimento do meu mestrado, e também por todos os conselhos, e “puxões de orelha”;

Às minhas amigas e colegas de pós-graduação, Suellen Scheibel e Nadine Woruby, pela companhia, apoio, ajuda durante todo o mestrado. Todos os cachorrões que comemos após as análises e passeios de finais de semana, idas ao Gatil, inúmeras fotos, conversas, desabafos, risadas sem fim;

Às amigas e estagiárias, Marina Cortellini, Laira Fontinhas, Adriane Baba, pela imensa ajuda nas análises laboratoriais e amizade dentro e fora do campus. As melhores estagiárias que poderia pedir, sem dúvida;

Ao meu namorado, Maicon, que apesar de ter “chegado” no final dessa minha caminhada me incentivou, animou com palavras e atitudes a escrever este trabalho;

Ao grupo de estudos de nutrição de animais de companhia da UEM e aos gatos do CEENUFEL, que participaram do experimento de palatabilidade;

À empresa Alltech, pelo fornecimento dos antioxidantes, materiais e reagentes utilizados neste projeto;

Ao professor Dr. Jesuí Virgílio e seus orientados, em especial ao Thiago Claus, por toda a ajuda com as análises de Oxitest, delineamento experimental e estatística;

À professora Dr^a. Paula Pinto, pela prontificação em tirar minhas dúvidas e dar dicas para melhorar meu trabalho;

À Universidade Estadual de Maringá, pela formação em Zootecnia e oportunidade de me tornar mestre;

A todos os professores do Departamento de Zootecnia, pelas valiosas lições que me foram passadas ao longo da Graduação e Pós-Graduação;

Aos técnicos do LANA, Creuza, Osvaldo e Augusto, por toda a ajuda nas análises, pelas orientações e por sempre manterem o laboratório em boas condições para a realização dos experimentos;

Ao Denilson, do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela ajuda com todas as “papeladas” de todo o processo do mestrado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos;

À Belinha, minha cadelinha de estimação que tanto me inspirou nessa caminhada, que sempre esteve ao meu lado nos momentos bons e difíceis, durante minhas noites de estudo, sempre pronta a me receber com tanta alegria, que me dá a certeza, cada dia mais, de que eu escolhi a profissão certa,

Minha imensa gratidão!

BIOGRAFIA

MARIANNE DE ALVARENGA BOYD, filha de Adilson dos Santos Boyd e Cecília Gonçalves de Alvarenga, nasceu em Maringá, Paraná, no dia 5 de abril de 1988.

Em dezembro de 2010, concluiu o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá.

Entre outubro de 2010 e março de 2011, atuou como estagiária no laboratório de Fertilização *in vitro* de Bovinos, do Centro de Biotecnologia da Fazenda Unicesumar.

Em agosto de 2013, iniciou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, como aluna não regular, na Universidade Estadual de Maringá.

Em março de 2014, iniciou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, nível de mestrado, na área de Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos em Nutrição de Cães e Gatos.

No dia 24 de agosto de 2016, submeteu-se à banca para defesa da sua Dissertação.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xxi
LISTA DE FIGURAS.....	xxiii
RESUMO.....	xxv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Produção de Gordura de Aves	2
2. Oxidação Lipídica.....	3
3. Antioxidantes	9
4. Espectroscopia de reflectância no Infravermelho Próximo – Near Infrared Spectroscopy (NIRS)	13
Referências Bibliográficas	16
II. OBJETIVOS GERAIS	20
III. <i>Shelf-life</i> da gordura de aves preservada com diferentes níveis de antioxidantes sintéticos	22
Resumo.....	22
Abstract	23
1. Introdução	24
2. Materiais e Métodos.....	26
2.1. Produção da Gordura de Aves.....	26
2.2. Aplicação dos Tratamentos da gordura e acondicionamento em estufa.....	27
2.3. Coleta de amostras e acondicionamento para as análises.....	27
2.4. Índice de Peróxido.....	28

2.5.	Índice de Acidez	29
2.6.	TBARS	30
2.7.	Dienos Conjugados.....	30
2.8.	Oxitest.....	30
2.9.	Determinação do perfil de ácidos graxos	30
2.10.	Quantificação das perdas de BHA e BHT	31
2.11.	Palatabilidade da gordura de aves em diferentes estágios de oxidação em gatos	33
2.12.	Curvas de calibração de parâmetros oxidativos na gordura de aves pelo NIRS	35
2.13.	Estatística.....	36
3.	Resultados.....	36
3.1.	Análise de dados referentes à gordura controle.....	36
3.2.	Análise de dados referentes à gordura de aves tratada com Antiox AV e BHT.....	41
3.3.	Quantificação de ácidos graxos na gordura através de CG	49
3.4.	Quantificação das perdas de BHT	51
3.5.	Palatabilidade	51
3.6.	NIRS	53
4.	Discussão	54
5.	Conclusão.....	60
6.	Referências.....	63

LISTA DE TABELAS

	Página
Capítulo III	
Tabela 1. Sequência de experimentos gerados pelo programa estatístico Design Expert 7.....	28
Tabela 2. Dados utilizados para a elaboração da curva de calibração de BHT.....	33
Tabela 3. Desafios de preferência alimentar em gatil coletivo (n=20) e em gaiolas individuais (n=20), de alimentos contendo diferentes índices de peróxido para gatos.....	35
Tabela 4. Predição de valores gerados de Oxistest, IP, IA, TBARS e Dienos com base nos modelos matemáticos da Figura 2.....	40
Tabela 5. Dados comparativos do IP da gordura controle armazenada em estufa, e em temperatura ambiente.....	41
Tabela 6. Resultados dos experimentos gerados pelo programa estatístico Design Expert 10, para as análises laboratoriais de Oxitest, IP, IA, TBARS e Dienos.....	42
Tabela 7. Análises de Variância (ANOVA) e modelos ajustados para cada Oxitest, IA, IP, TBARS e Dienos Conjugados, para gordura de aves tratada com cinco níveis crescentes de BHA+BHT.....	43
Tabela 8. Análises de Variância (ANOVA) e modelos ajustados para cada Oxitest, IA, IP, TBARS e Dienos Conjugados, para gordura de aves tratada com cinco níveis crescentes de BHT.....	45
Tabela 9. Ácidos graxos presentes na gordura de aves e suas respectivas concentrações nos diferentes momentos em que foram retirados da estufa.....	49

Tabela 10. Quantificação de BHT em amostra de gordura de aves, por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).....	50
Tabela 11. Razão de Ingestão (RI) nos testes de preferência alimentar para a verificação da capacidade dos gatos de discriminação entre dois alimentos.....	51
Tabela 12. Comparação entre a Razão de Ingestão (RI) para o alimento B nos desafios em gaiolas individuais ou em gatil coletivo.....	51
Tabela 13. Curva de calibração para a estimativa de IA, IP, TBARS e Dienos em amostras de gordura de aves pelo NIRS.....	52
Tabela 14. Comprimentos de onda utilizados pelo NIRS para a elaboração das curvas de calibração de IA, IP, TBARS e Dienos.....	53
Tabela 15. Preferência alimentar entre o alimento Controle versus com diferentes teores de peróxido (10, 20, 40 e 80 mEq/kg). Testes realizados em gatil coletivo ou em gaiolas individuais.....	60

LISTA DE FIGURAS

	Página
Capítulo I.	
Figura 1. Esquema de como é produzida farinha e gordura de vísceras de aves na indústria frigorífica.....	2
Figura 2. Reações e estequiometrias do processo de autooxidação lipídica (adaptado de Gray, 1978).....	4
Figura 3. Reações e estequiometrias do método iodométrico (Shahidi e Zhong, 2005).....	6
Figura 4. Mecanismo de ação de antioxidantes primários (adaptado de Antolovich et al., 2002).....	10
Figura 5. Reação do radical inerte do antioxidante com radicais livres (adaptado de Antolovich et al.,2002).....	10
Figura 6. Estrutura química de BHA, BHT e TBHQ.....	11
Capítulo III.	
Figura 7. Espectro UV de BHT.....	33
Figura 8. Cromatograma a 280nm.....	33
Figura 9. Curva de calibração para quantificação de BHT.....	34
Figura 10. Curvas de Índice de Acidez (IA), Índice de Peróxido (IP), TBARS, Dienos Conjugados e Oxitest em estufa e IP à temperatura ambiente, em amostra de gordura de aves sem adição de antioxidantes.....	38
Figura 11. Possíveis correlações entre as análises de IA, IP, TBARS e Dienos.....	39

Figura 12. Gráfico de correlação do Índice de Peróxido predito à temperatura ambiente, em dias, e em estufa de ventilação forçada a 60°C, em horas.....	41
Figura 13. Gráfico de superfície com estimativa de valor de peróxido em gordura de aves estabilizada com 200mg/kg de BHT e estocada por aproximadamente 100 dias.....	47
Figura 14. Gráfico de superfície com estimativa de valor de peróxido em gordura de aves estabilizada com 200mg/kg de BHA/BHT e estocada por aproximadamente 100 dias.....	48
Figura 15. Gráficos de superfície-resposta de Oxitest (minutos), IP (mEq kg ⁻¹), IA (mg NaOH g ⁻¹), TBARS (μM g ⁻¹) e Dienos Conjugados (mmol L ⁻¹). O eixo vertical representa o tempo em estufa (horas), e o eixo horizontal os níveis de BHA+BHT adicionado à gordura de aves (ppm).....	49
Figura 16. Gráficos de superfície-resposta de Oxitest (minutos), IP (mEq kg ⁻¹), IA (mg NaOH g ⁻¹), TBARS (μM g ⁻¹) e Dienos Conjugados (mmol L ⁻¹). O eixo vertical representa o tempo em estufa (horas), e o eixo horizontal os níveis de BHT adicionado à gordura de aves (ppm).....	50
Figura 17. Percepção olfativa pelo alimento B em função do índice de peróxido da gordura de aves.....	54
Figura 18. Espectro da amostra controle de gordura de aves, gerada pelo NIRS.....	55

RESUMO

Os principais objetivos deste estudo foram avaliar a capacidade de estabilização de cinco níveis crescentes (50, 101,26, 225, 348,74 e 400 ppm) de dois tipos de antioxidantes sintéticos, BHT puro e um mix de BHA e BHT, em gordura de aves, bem como as implicações da oxidação lipídica na palatabilidade de alimentos completos para gatos. Com a finalidade de acelerar o processo oxidativo, as amostras de gordura estabilizadas mais o controle negativo (amostra sem adição de antioxidantes) foram colocadas em estufa a 60°C por 10 dia e alíquotas eram coletadas de acordo com o *design* experimental estatístico definido pelo programa estatístico Design Expert 7, após 48, 76, 144, 212 e 240 horas de aquecimento. Duas amostras de gordura foram mantidas à temperatura ambiente por um período de 6 meses, sendo uma delas, amostra controle (sem adição de antioxidante), e a outra, estabilizada com 200 ppm de BHA+BHT. Para acompanhar o desenvolvimento da oxidação lipídica na gordura, foram realizadas análises de Índice de Peróxido (IP), Índice de Acidez (IA), TBARS, Dienos Conjugados, Oxitest, Cromatografia gasosa (CGS) e Cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Além disso, amostras de gordura foram escaneadas no NIRS com a finalidade de se obter curvas de calibração para qualidade de gordura, utilizando os principais métodos de avaliação do processo oxidativo. TBARS e IP mostraram ser os métodos convencionais que apresentam resultados mais coerentes entre si. Neste estudo foi possível verificar que 0,22 mM de equivalente de malonaldeído e 10mEq de peróxido são valores limítrofes para a qualidade da gordura de aves. Além disso, Oxitest se mostrou um método eficaz nos estudos com antioxidantes sintéticos. Neste estudo, para a gordura controle negativo, cada hora em estufa correspondeu a cerca de 0,74 dias de estocagem a temperatura ambiente. O NIRS se mostrou uma ferramenta passível de uso na estimativa da qualidade de gordura de aves, quando utilizando parâmetros como

IP e TBARS, que apresentaram valores de R^2 iguais a 0,9954 e 0,9988, respectivamente. As doses mínimas de BHA+BHT e BHT puro necessárias para estabilizar a gordura deste estudo por pelo menos 100 dias foram de 390 mg/kg e 200 mg/kg, respectivamente. Também foi possível concluir, por meio deste estudo, que gatos são sensíveis em detectar a presença de peróxidos em alimentos, porém quando em baixas concentrações, o IP não influencia no consumo desta categoria animal. Neste estudo os animais apresentaram repulsa pelo alimento, quando este apresentava valor de IP superior a 5 mEq/kg. No entanto, devido as perdas significativas de ácidos graxos essenciais ao longo do processo oxidativo da gordura e a formação de produtos tóxicos, não é recomendado o uso de gordura de aves oxidada para gatos.

Palavras-chave: estabilizantes, gatos, gordura de frango, oxidação, petfood, palatabilidade

ABSTRACT

The aims of the present study were to evaluate the stabilization capacity of five levels (50, 101.26, 225, 348.74 and 400 ppm) of two different synthetic antioxidants, pure BHT and a commercial mix of BHA and BHT (BHA+BHT), in poultry fat, as well as the implications of lipidic oxidation on the palatability of commercial food for cats. The stabilized samples plus a control sample (poultry fat without preserver) were placed inside an oven and submitted to 60°C during 10 days. There were collected smaller samples on predetermined periods by the statistic software Design Expert 7 after 48, 76, 144, 212 and 240 hours of heating. Two samples of fat were maintained at room temperature during 6 months. One was not stabilized with any type of antioxidant and the other was stabilized with 200 ppm of BHA+BHT. In order to observe the lipidic oxidative process in the fat, there were used known methods such as Peroxid Value (PV), Total free fatty acid number (FFA), TBARS, Dienes, Oxitest, Gas chromatography (CGS) and High performance liquid chromatography (HPLC). Poultry fat samples were scanned on NIRS in order to obtain calibration curves for fat quality control. TBARS and PV were the methods that showed better interaction among them. In this study, it was verified that 0.22 mM of equivalent MDA and 10 mEq of peroxide are the limit values to assure the quality of poultry fat. Oxitest proved to be a good method to study the synthetic antioxidants. Also, in this study, when it comes about the control sample, each hour in the oven under 60°C is equal to 0.74 days of storage at room temperature. NIRS is an efficient tool to predict the fat quality when using methods like TBARS and Peroxid Value that presented R^2 values of 0.9988 and 0.9954, respectively. The ideal doses of BHT and BHA+BHT when aiming to maintain the fat stabilized for at least 100 days stored, were of 200 ppm and 390 ppm, respectively. With this same study, we were able to see that cats can detect the presence of peroxide

in their food however when in low concentrations, it does not affect the consumption by these same animals. The animals showed signs of repulse when the food PV was superior to 5 mEq/kg. Due the losses of essential fatty acids during the fat oxidative process and production of toxic products, cats should not be fed with rancid food.

Key words: cats, chicken fat, oxidation palatability, pet food, preservatives

I. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o mercado pet tem tido grande expressividade na economia do Brasil. De acordo com dados do IBGE (2015), 44,3 % dos lares brasileiros têm pelo menos um cão, enquanto 17,7 % têm ao menos um gato. O número de animais destas duas espécies ultrapassa a marca de 70 milhões, deixando o Brasil como o segundo colocado em tamanho de população de cães e gatos no mundo. A indústria pet foi responsável pelo faturamento de cerca de 16 bilhões de reais em 2014, sendo que cerca de 66,9% deste total corresponde a pet food (PetBrasil, 2016).

Na elaboração de alimentos para cães e gatos, as proteínas de origem animal são de grande importância, pois são fontes de aminoácidos essenciais ao bom desenvolvimento e manutenção do animal (Case, 2011). Devido à grande quantidade de resíduos provenientes de abatedouros, as fontes proteicas mais utilizadas na formulação de alimentos para cães e gatos são as farinhas de origem animal, destacando-se entre elas, a farinha de vísceras de aves.

As fontes de gordura também representam outro grupo de ingredientes igualmente importantes nos alimentos destinados aos cães e gatos. Esta é utilizada com a finalidade de fornecer energia e ácidos graxos essenciais, além de melhorar os aspectos organolépticos do alimento (Case, 2011). Para tal, a indústria de pet food utiliza tanto óleos vegetais como gordura animal, dentre os quais, a mais comum e utilizada é a gordura de aves.

Apesar de muito utilizada, pela sua origem proveniente de material de descarte do abate, a gordura de aves é altamente susceptível ao processo de deterioração, tanto microbiana quanto oxidativa e, por este motivo a utilização de aditivos para sua preservação se fazem fundamentais, especialmente antioxidantes. Neste projeto de

pesquisa, estudou-se o *shelf-life* da gordura de frango estabilizada com antioxidantes sintéticos em diferentes níveis e os efeitos do processo de oxidação sobre o valor nutricional e palatabilidade de alimentos

1. Produção de Gordura de Aves

O Brasil é um grande produtor e exportador de proteína animal, sendo líder do *ranking* mundial de exportação de carne de frango. Só no quarto trimestre de 2014, foram abatidos 1,406 bilhão de frangos, o equivalente a 3,177 milhões de toneladas em carcaça (IBGE, 2015; USDA, 2015).

Os resíduos da Indústria Frigorífica, ou subprodutos de origem animal, podem apresentar alto valor nutritivo, mas por não serem utilizados na alimentação humana, acabam sendo destinados para a alimentação animal. É o que acontece com as vísceras resultantes do abate de aves em larga escala.

A gordura de aves é resultante do processo de fabricação de farinha de vísceras. Essa farinha pode conter, além das vísceras, cabeça e pé de frangos abatidos. A figura 1 mostra como se dá o processo de produção desta farinha.

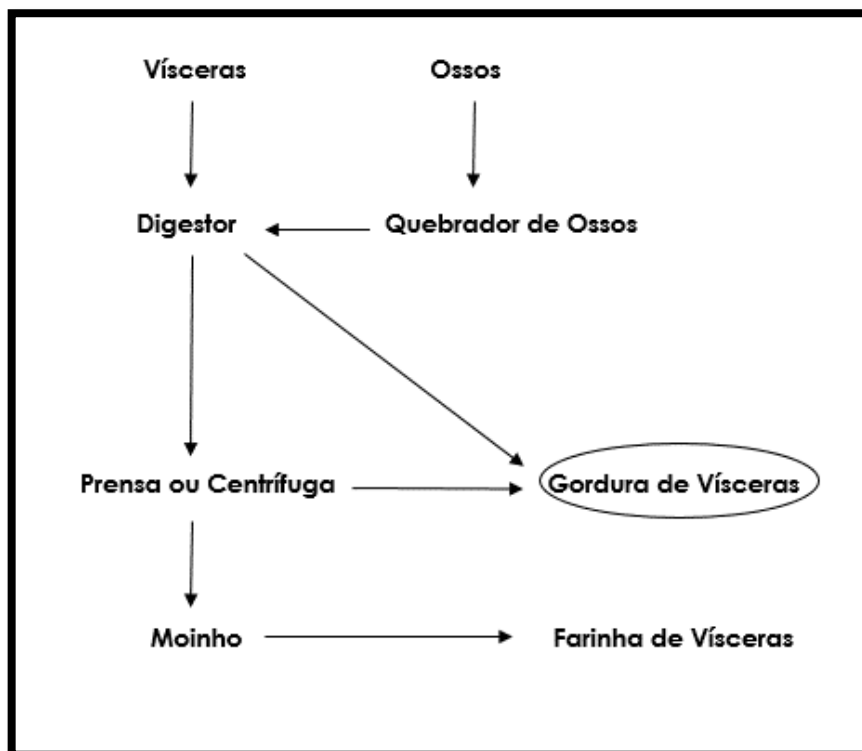


Figura 1. Esquema de como é produzida farinha e gordura de vísceras de aves na indústria frigorífica.

É importante notar, que em primeiro lugar, os ossos provenientes das cabeças e pés de aves são quebrados. Logo em seguida, com o auxílio de uma peneira, é separada a parte líquida da parte sólida, originando parte da gordura. A porção sólida é submetida ao digestor, e passa por processo de cozimento em torno de 110°C durante 60 a 90 minutos. Após a cocção, as vísceras cozidas são levadas a prensa, e praticamente todo o líquido que ainda estiver presente no material será retirado, originando um produto com água e gordura. Por decantação de aproximadamente 24 horas, água e gordura são separadas. As vísceras prensadas são resfriadas e levadas ao moinho, então serão transformadas em farinha.

A gordura resultante do processo de fabricação de farinha é armazenada preferencialmente em tanques de aço inox, e se encontra protegida de luz. Para evitar a oxidação pela presença de umidade, calor ou até mesmo ar, são adicionados antioxidantes, geralmente sintéticos, à gordura (Bellaver e Zanotto, 2004).

Para o controle da qualidade de gorduras e óleos destinados à alimentação animal, é importante que sejam estabelecidos parâmetros para a padronização dos mesmos. Esses devem ser controláveis em laboratório, e em seu conjunto expressarem o grau de qualidade do produto em questão (Bellaver e Zanotto, 2004). Dentre os parâmetros passíveis de análise laboratorial, estão: ácidos graxos livres, perfil de ácidos graxos e lipídeos totais, coloração, umidade, índice de peróxidos, estabilidade oxidativa, dentre outros métodos utilizados pela Indústria (Bellaver e Zanotto, 2004).

2. Oxidação Lipídica

Os lipídios, presentes em gorduras e óleos, são de grande importância na nutrição humana e animal. Estes componentes estão diretamente relacionados às propriedades organolépticas que conferem sabor, cor e textura para os alimentos, tornando-os mais atrativos, além de serem fontes de energia, ácidos graxos essenciais e carreadores de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) (Silva et al., 1999; Tian et al., 2013).

A rancidez ou oxidação lipídica é um processo químico inevitável que afeta diretamente tanto a matéria-prima quanto o produto final. Seu desenvolvimento leva à

formação de *off-flavors* e *off-odors* (Gray, 1978; Silva et al., 1998) e produtos tóxicos, além da degeneração de ácidos graxos essenciais e vitaminas (Choe e Min, 2006; Medina-Meza et al., 2014).

Além da autooxidação lipídica, que é a primeira reação que leva à degeneração do alimento, existem outros agentes que catalisam a oxidação, como a luz (fotooxidação) e a presença de enzimas no meio (oxidação enzimática) (Silva et al., 1999; Choe e Min, 2006). A autooxidação é um fenômeno espontâneo que ocorre ao longo do tempo, requer que os ácidos graxos poli-insaturados estejam na forma de radicais livres e como pode ser observado na figura 2, inclui as etapas de iniciação, propagação e terminação (Gray, 1978; Silva et al., 1999; Choe e Min, 2006; Barriuso et al., 2013).

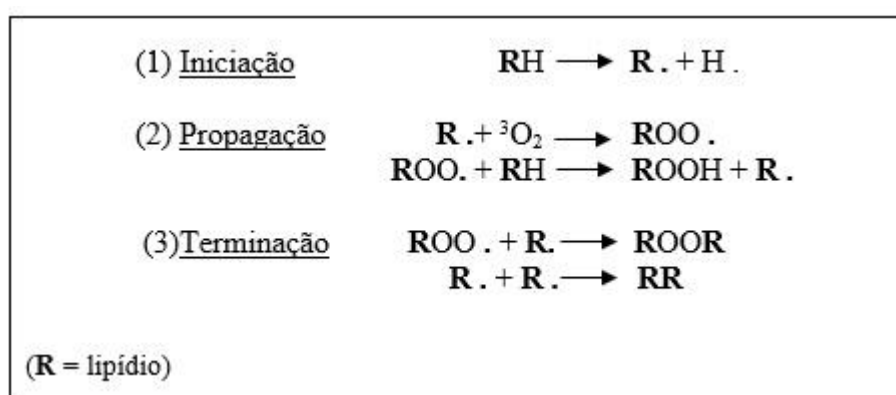


Figura 2. Reações e estequiometrias do processo de autooxidação lipídica (adaptado de Gray, 1978).

A iniciação é caracterizada pela perda de um radical Hidrogênio e desaparecimento dos substratos de oxidação, como oxigênio e lipídio insaturado (Silva et al., 1999; Medina-Meza et al., 2014). Já a propagação é etapa da evolução oxidativa, em que há o aparecimento dos produtos primários da oxidação, conhecidos como peróxidos e hidroperóxidos (Silva et al., 1999; Barriuso et al., 2013). Estes produtos primários não apresentam cor, sabor ou odor, mas por serem bastante instáveis, estão susceptíveis a sofrerem degradação, levando assim a formação de produtos secundários da oxidação de peso molecular mais baixo, como os aldeídos, cetonas e epóxidos, que caracterizam por sua vez, a etapa de terminação (Silva et al., 1999; Tian et al., 2013; Medina-Meza et al., 2014).

A fotooxidação é uma reação oxidativa causada por radiação UV (luz), na presença de fotossensibilizadores como a clorofila e mioglobina. Nesse processo também são formados hidroperóxidos quando um oxigênio singlete (1O_2) reage com a dupla ligação de um ácido graxo poli-insaturado (Frankel, 1991; Silva et al., 1999;

Ramalho e Jorge, 2006). Os hidroperóxidos formados neste tipo de reação são semelhantes aos produzidos na autooxidação, e assim como estes, aqueles estão sujeitos à degradação e conseqüente formação de aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos.

Por fim, quando há a ação da enzima lipoxigenase na reação oxidativa, esta é conhecida por oxidação do tipo enzimática. São formados hidroperóxidos e peróxidos, por meio da adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poli-insaturada, reação que é catalisada pela lipoxigenase (Silva et al., 1999; Ramalho e Jorge, 2006).

Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica em alimentos

Há vários anos, centenas de diferentes métodos para se avaliar o grau e/ou estágio de oxidação lipídica em alimentos, vêm sendo desenvolvidos em laboratórios e utilizados em larga escala pela indústria alimentícia. Para se obter a avaliação completa, precisa e confiável de uma amostra de alimento, óleo ou gordura, é necessária a combinação de diferentes métodos físicos, físico-químicos e químicos, ao longo de um período pré-estabelecido pelo analista (Barriuso et al., 2013). Como visto anteriormente, ao longo do processo oxidativo, são formados diferentes produtos em diferentes momentos. Além disso, o perfil de ácidos graxos do alimento em questão, a presença de outros nutrientes e o mecanismo ao qual está sofrendo oxidação, tornam as análises mais complexas e exigem combinação de diferentes metodologias para conclusão final (Silva et al., 1999; Barriuso et al., 2013).

Dependendo das condições em que a amostra é armazenada, a oxidação lipídica pode se desenvolver mais rapidamente ou não. Os testes de *shelf-life* (vida de prateleira) podem ter duração de algumas horas, até alguns poucos anos. Devido à demanda por resultados mais imediatos, a maioria das pesquisas realizadas em indústria, são realizadas por meio de aceleração do processo oxidativo, permitindo estimar a susceptibilidade à oxidação e a estabilidade oxidativa de uma determinada amostra durante um período pré-estabelecido (Colakoglu, 2007; Pitaro et al., 2012; Barriuso et al., 2013).

A análise sensorial é considerada a mais autêntica pois mede a aceitação ou rejeição do consumidor do produto em questão (Silva et al., 1999). No entanto por ser uma análise subjetiva, e não ser capaz de indicar o estágio exato do processo oxidativo, não apresenta reprodutibilidade, não sendo, portanto, prática.

Peróxidos e dienos conjugados são os produtos primários da oxidação. No caso dos peróxidos, que são os representantes principais desta classe de compostos, sua mensuração se dá por diferentes métodos, como os colorimétricos, iodométrico, volumétrico, cromatografia líquida e gasosa, além do método FOX (*ferrous oxidation method*) (Dobarganes e Velasco, 2002; Shahidi e Zhong, 2005; Barriuso et al., 2013).

Dentre todos os métodos propostos para análise de Peróxido (IP), o Iodométrico é o mais comumente utilizado principalmente por sua precisão e simplicidade. É um método de titulação desenvolvido há mais de 70 anos, que mede a quantidade de iodo liberada partir da decomposição do iodeto de potássio pelos hidroperóxidos (Dobarganes e Velasco, 2002; Barriuso et al., 2013). O indicador utilizado é o amido, a solução de titulação é o Tiosulfato de Sódio e o valor é dado em mEq de hidroperóxidos por kg de amostra. Na figura 3, é possível observar as reações ocorridas quando realizado o método iodométrico.

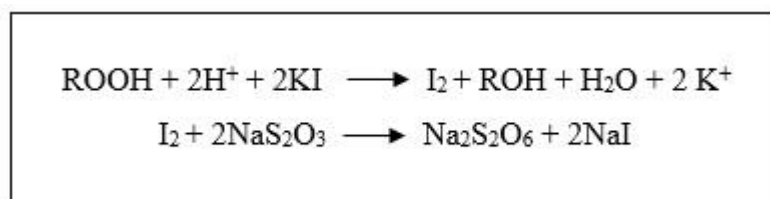


Figura 3. Reações e estequiometrias do método iodométrico (Shahidi e Zhong, 2005).

O método Iodométrico, apesar de ser considerado um método clássico, apresenta falhas, sendo alvo de críticas por diversos autores. Isso se dá principalmente porque durante a análise, pode ocorrer a formação espontânea de hidroperóxidos, o que levaria a superestimação ou o iodo pode se fixar nas duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, levando a subestimação do resultado. Além disso, há dificuldades em se estabelecer o ponto final da titulação quando o valor de peróxido é muito baixo (Silva et al. 1999; Shahidi e Zhong, 2005; Barriuso et al., 2013).

Quando na formação de hidroperóxidos a partir de ácidos graxos poli-insaturados, são produzidos dienos conjugados, por meio do reajuste das duplas ligações (deslocalização de elétrons) (Dobarganes e Velasco, 2002; Barriuso et al., 2013). Estes compostos apresentam grande absorção entre 230 e 235nm do espectro UV, que pode ser medida por técnicas de espectrofotometria. A análise de dienos conjugados permite a avaliação do início da oxidação, mas não possibilita a classificação dos compostos que se encontram na amostra de lipídio (Antolovich et al., 2002; Barriuso et al., 2013).

Conforme os peróxidos vão sofrendo decomposição, outros compostos como aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos são formados, e são conhecidos por produtos secundários da oxidação. Dentre os aldeídos, o malonaldeído (MDA) é o encontrado em maior quantidade e por esta razão, é utilizado como marcador da oxidação (Osawa et al., 2008; Barriuso et al., 2013).

O teste das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) é o mais utilizado na quantificação de malonaldeídos (MA). Trata-se da reação entre uma molécula de MDA e duas de TBA, que produzem coloração avermelhada com absorção máxima em espectrofotômetro a 532-535nm (Kohn e Liversedge, 1944; Bernheim et al., 1948; Antolovich et al., 2002). O resultado é expresso em μM de malonaldeído por grama de gordura. Há muitos anos, diversas adaptações do método vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de tornar a análise mais precisa para a amostra envolvida na análise (Hoyland e Taylor, 1991).

Apesar de ser considerado um teste clássico, existem várias críticas ao método TBARS. O perfil de compostos da amostra, as condições ambientais durante a análise e os reagentes utilizados na metodologia constituem alguns dos fatores que podem interferir nos resultados finais, superestimando-os em alguns casos e subestimando-os em outros (Barriuso et al., 2013).

Outros métodos utilizados para a caracterização e quantificação de aldeídos envolvem cromatografia gasosa ou líquida, além do Índice de p-anisidina (Shahidi e Zhong, 2005; Barriuso et al., 2013). Este último apresenta boas correlações com o Índice de Peróxido, sendo que ambos traduzem o valor total de oxidação (totox), dado por:

$$\text{Valor Totox} = 2 (IP) + (IpA)$$

Sendo IP = Índice de Peróxido; IpA = Índice de p-anisidina (Silva et al., 1999, Shahidi e Zhong, 2005).

Implicações da oxidação lipídica na palatabilidade de alimentos para cães e gatos

Há diferentes conceitos para o termo “palatabilidade”, bem como diversos fatores ligados à palavra. Uma maneira de simplificar seria definir um alimento como palatável, aquele que traz “alegria”, “bem-estar”, “prazer” ao ser ingerido. Portanto, uma maneira de classificar um alimento como sendo palatável ou não, seria observar se

o animal o consome somente em situações de fome, ou se há uma clara preferência pelo mesmo (Stasiak, 2002).

Durante a formulação de um alimento completo para cães ou gatos, o nutricionista se atenta principalmente em atender os requerimentos nutricionais da espécie e categoria animal. São então, adicionados atrativos que ressaltam o odor e sabor, com o objetivo de que o animal consuma o alimento e assim se mantenha saudável. No entanto, é importante ressaltar, que, nem todo alimento palatável é necessariamente saudável. Os conhecidos prêmios, usados para recompensa, são de maneira geral, muito bem aceitos pelos pets, mas em sua maioria apresentam baixo valor nutricional (Case, 2011).

Um ponto a ser levado em consideração está relacionado aos hábitos alimentares e peculiaridades de cada espécie. Acredita-se que os gatos tenham sofrido uma domesticação mais tardia quando comparados aos cães, razão pelo qual, continuam sendo classificados como animais carnívoros, enquanto o cachorro já pode ser considerado um ser onívoro, com hábitos alimentares mais próximos aos dos humanos (Bradshaw et al., 2000). Além do mais, os gatos apresentam altas necessidades por proteína, fato que também influencia em suas preferências por alimentos cárneos (Green et al., 2008). Devido a ineficiências metabólicas, o gato doméstico não pode receber uma dieta rica em ingredientes de origem vegetal, o que não ocorre com os cães, que são capazes de viver bem à base de dietas com quantidades menores de carne. Esses fatores, somado ao fato de que gatos se recusam a comer alimentos que não apreciam, a ponto de passarem fome e desenvolverem problemas clínicos, torna a palatabilidade um ponto crucial na dieta destes animais (Zaghini e Biagi, 2005; Green et al., 2008).

Os hidroperóxidos são não voláteis e inodoros. Entretanto, como visto anteriormente, se decompõem facilmente tanto por meio de reações espontâneas como reações catalisadas em compostos aromáticos voláteis, conhecidos por *off-flavours*. A natureza dos *off-flavours* depende exclusivamente da composição de seu substrato e também do grau de oxidação. Um exemplo clássico é o sabor cremoso ou metálico que pode se desenvolver na gordura do leite. Acredita-se também que os aldeídos não sejam palatáveis nem para cães, nem para gatos, assim como não o são para humanos (Case, 2011; Lima e Abdalla, 2001).

Apesar do importante papel dos subprodutos na nutrição de animais de companhia e sua alta susceptibilidade à oxidação, com conseqüente problema na palatabilidade do alimento, ainda faltam estudos para se averiguar os efeitos da

oxidação sobre a palatabilidade. Gross e colaboradores, em 1994, puderam verificar os efeitos de alimentos completos para cães que foram armazenados durante diferentes períodos de tempo, sob altas e baixas temperaturas, na palatabilidade do alimento para cães adultos. Os pesquisadores observaram um decréscimo no consumo das dietas que apresentaram valores mais altos de Índice de Peróxido.

Devido aos possíveis danos biológicos ao organismo dos animais, não é recomendada a adição de ingredientes oxidados aos alimentos a serem fornecidos por períodos prolongados. Para a preservação destes alimentos gordurosos são então adicionados antioxidantes, que previnirão a oxidação, garantindo que o sabor e aroma do produto final não sejam afetados e possam ser consumidos normalmente pelos animais.

3. Antioxidantes

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que quando em baixas concentrações, é capaz de atrasar ou inibir a oxidação lipídica do substrato em que está presente (Halliwell et al., 1995). Há muitos anos, diferentes tipos de antioxidantes vêm sendo estudados e desenvolvidos, porém, nem todos podem ser utilizados na alimentação humana ou animal, por apresentarem características indesejáveis (Ramalho e Jorge, 2006).

Algumas propriedades devem ser observadas na seleção de um antioxidante a ser utilizado em alimentos, como por exemplo: o produto não deve apresentar cor, sabor ou odor, ou modificar as características do alimento em que será adicionado, deve ser de fácil aplicação e eficaz em baixas concentrações, não deve gerar nenhum tipo de produto tóxico, e necessita apresentar grande estabilidade durante todo o processamento e armazenamento (Ramanho e Jorge, 2006).

São classificados em antioxidantes primários ou bloqueadores, responsáveis por atrasar ou inibir a fase de iniciação, e inibir a propagação, e secundários ou complexantes, que retardam o início da oxidação lipídica (Antolovich et al., 2002).

Na figura 4, observa-se que os antioxidantes primários impedem a formação de radicais livres, doando seus radicais hidrogênicos aos radicais lipídios, inibindo dessa forma a iniciação da autooxidação, além de reagirem com radicais peroxil, impedindo a reação de propagação (Antolovich et al., 2002; Pokorný, 2007).

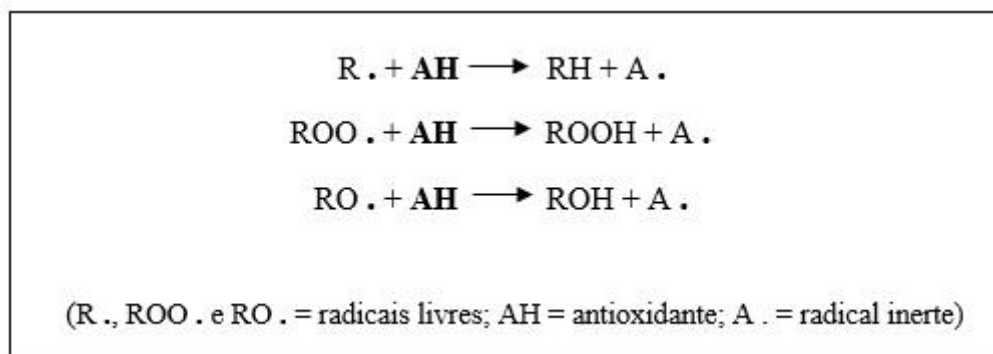


Figura 4. Mecanismo de ação de antioxidantes primários (adaptado de Antolovich et al., 2002).

O hidrogênio livre do antioxidante em questão se liga aos radicais livres, formando moléculas inativas para dar continuidade a reação de oxidação, e um radical inerte, que mais tarde irá interferir no processo de oxidação, pois se ligará a outros radicais livres, formando compostos peroxi-antioxidantes, conforme esquematizado na figura 5 (Antolovich et al., 2002; Ramanho e Jorge, 2005).

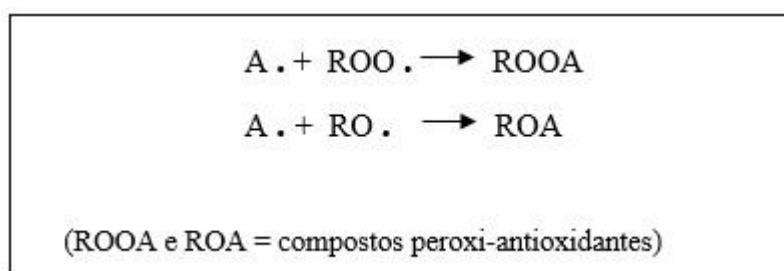


Figura 5. Reação do radical inerte do antioxidante com radicais livres (adaptado de Antolovich et al., 2002).

A eficiência de um antioxidante primário é maior tanto quanto menor for a força de ligação entre os radicais A-H do mesmo. Este tipo de antioxidante pode ser encontrado naturalmente ou ser produzido artificialmente, sendo os mais conhecidos os polifenóis, como é o caso dos tocoferóis (naturais ou biológicos), o butilhidroxianisol (BHA), o butilhidroxitolueno (BHT), o t-butilhidroquinona (TBHQ) e os galatos, sendo estes últimos todos sintéticos (Antolovich et al., 2002; Ramalho e Jorge, 2005; Gülçin, 2012).

Compostos fenólicos e sua capacidade antioxidante

Os compostos fenólicos podem ser definidos como substâncias que possuem pelo menos um anel aromático em sua estrutura, com um ou mais substituintes

hidroxílicos (Angelo e Jorge, 2007). Uma grande variedade de compostos fenólicos é encontrada na natureza, sendo estes os maiores responsáveis por conferir cor, sabor e textura às plantas (Gülçin, 2012). Existem cerca de cinco mil fenóis, com as mais variadas funções, destacando-se neste grupo, os tocoferóis, taninos, ácidos fenólicos, flavonoides, entre outros.

Os flavonoides apresentam capacidade antioxidante graças aos grupos hidroxilo fenólicos ligados aos anéis aromáticos, os quais permitem que haja doação de hidrogênio, quelação do oxigênio singlete e de metais, ativam enzimas antioxidantes, inibem oxidases, entre outros (Carocho e Ferreira, 2013). Os ácidos fenólicos por sua vez têm grande impacto sobre radicais peroxil, hidroxil e peroxinitritos, além de ser o precursor de muitos taninos (Carocho e Ferreira, 2013).

Há mais de 40 anos, os antioxidantes sintéticos vêm ganhando mais atenção nas áreas de farmacologia e toxicologia (Kahl, 1984). A atividade antioxidante de compostos naturais é possível de ser avaliada por meio do desenvolvimento e conhecimento de antioxidantes sintéticos, que estabelecem padrão de como deve acontecer a inibição da oxidação em um produto (Carocho e Ferreira, 2013). Na figura 6, estão os compostos fenólicos sintéticos mais utilizados em alimentos e fármacos, BHA, BHT e o TBHQ (Gülçin, 2012).

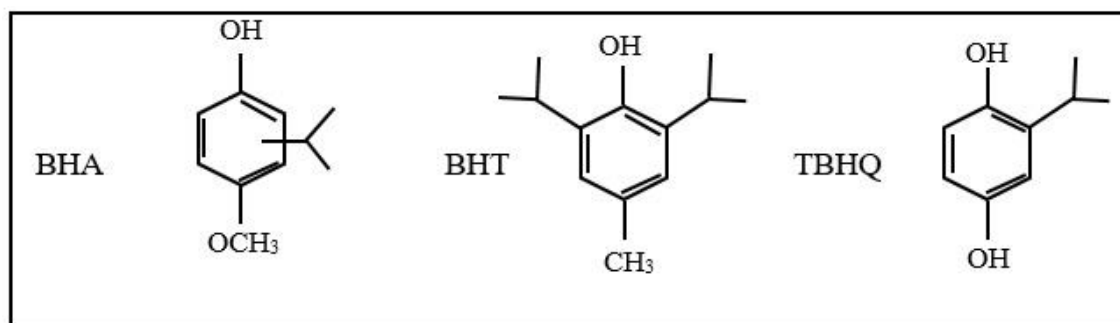


Figura 6. Estrutura química de BHA, BHT e TBHQ.

Devido suas estruturas, estes antioxidantes são capazes de doar um próton a um radical livre, transformando seus derivados fenólicos em radicais livres, que não sofrerão oxidação (Ramalho e Jorge, 2006). BHA e BHT apresentam funções semelhantes, além de serem sinergistas entre si. Porém, o uso de BHA é mais efetivo em gorduras animais enquanto BHT é mais comumente utilizado em produtos de origem vegetal, como margarinas e cereais (Babich, 1982; Ramalho e Jorge, 2006).

Apesar de BHA e BHT serem os antioxidantes sintéticos mais utilizados, existem legislações que controlam a quantidade que esses produtos podem ser adicionados aos alimentos. Isso se dá, principalmente por motivos de dúvidas se estes compostos são tóxicos ou não, e se podem causar câncer quando ingeridos em grandes quantidades (Gülçin, 2012). Entre 2011 e 2012, a European Food Safety Authority (EFSA), estabeleceu um consumo máximo diário de 0,25 mg/kg de BHT 0,01 mg/kg de BHA, para adultos e crianças, sendo estas quantidades consideradas aceitáveis, e difíceis de serem ultrapassadas (Carocho e Ferreira, 2013).

De acordo com Pokorný (2007), 200 mg/kg (0,02 % na base lipídica) é a quantidade máxima aconselhada a ser incluída em alimentos e o consumo diário máximo de lipídios recomendado é de 100 g. O pesquisador explica que se toda a fração lipídica do alimento consumido for estabilizada com o máximo de concentração de antioxidante sintético permitida, o indivíduo estará ingerindo 20 mg de antioxidante sintético, e mesmo se fosse consumido 100 vezes mais do que esta quantidade, ainda assim, não haveria danos à saúde.

Há ainda pesquisadores, que acreditam que os antioxidantes sintéticos podem na verdade, prevenir o câncer, atuando como antioxidantes biológicos, no combate aos radicais livres (Kahl, 1984; Carocho e Ferreira, 2013). Na Europa e Canadá, o uso de TBHQ em alimentos, foi proibido, assim como no Japão, que também colocou fim ao uso do BHA (Shahidi, 2000). Devido a estas controvérsias, diversos antioxidantes naturais vêm sendo estudados, bem como tecnologias como o encapsulamento, com a finalidade de serem adicionados principalmente em alimentos (Tian et al., 2013).

Em virtude da grande variedade de antioxidantes, sintéticos e naturais, estudados e produzidos ao longo do tempo, com diferentes propriedades, modos de ação e dosagens recomendadas, métodos para avaliar a capacidade antioxidante de um produto foram desenvolvidos (Shahidi e Zhong, 2005). Assim como para se avaliar o grau de oxidação lipídica, quando na análise da atividade antioxidante, o ideal é combinar diferentes testes para se obter certeza dos resultados obtidos.

Os métodos mais utilizados correspondem aqueles que utilizam a oxidação acelerada, ou seja, o material estabilizado com determinado antioxidante é submetido à uma fonte de calor, luz ou pressão, e amostras vão sendo retiradas em períodos determinados, com o objetivo de serem analisadas por métodos, como IP, TBARS, P-anisidina, entre outros (Antolovich et al., 2002). Dentre os mais conhecidos, pode-se

citar o Método de Schaal, em que a amostra é colocada em estufa a 60°C e ali permanece por tempo pré-estabelecido pelo analista.

Há ainda métodos que combinam altas temperaturas com alta pressão, e então definem o período de indução, ou *end point*, que seria o momento em que todos os compostos possíveis de serem oxidados, já se esgotaram, neste grupo. Estes testes fornecem o tempo de prateleira estimado de um determinado ingrediente, mas suas condições não são compatíveis com as reais, como em temperatura ambiente. Dentre os mais conhecidos, podem ser citados o Oxitest e Rancimat (Antolovich et al., 2002). Há ainda métodos colorimétricos, como a capacidade de sequestro dos radicais livres pelos antioxidantes da amostra (DPPH), muito utilizado para amostras de antioxidantes naturais, e de fluorescência como o ORAC - Oxygen Radical Absorbance Capacity (Alam et al., 2013).

4. Espectroscopia de reflectância no Infravermelho Próximo – Near Infrared Spectroscopy (NIRS)

Quando a energia eletromagnética incide sob determinada substância, ela ou é absorvida, ou transmitida dependendo de qual é sua frequência, e da estrutura molecular da substância em questão. As moléculas naturalmente vibram, se esticando (simetricamente ou assimetricamente) ou se dobrando. Quando existe uma combinação entre uma frequência de energia perturbante e frequência natural de vibração, a molécula absorve energia, e um espectro pode ser visualizado (Kumar et al., 2011).

A descoberta da energia do infravermelho próximo data do século 19, com William Herschel. Suas primeiras aplicações industriais aconteceram na década de 1950, mas somente em meados da década de 1980, com o desenvolvimento da fibra ótica, que a técnica ganhou mais adeptos, principalmente no meio científico (Kumar et al., 2011; Lima e Bekker, 2011). Nos dias atuais, sua utilização é tão ampla, que abrange desde indústrias alimentícias até análises forenses.

O NIRS é um método espectroscópico vibracional baseado nos *overtones* moleculares e combinações de vibrações C-H, O-H e N-H, sendo capaz de dar informações a respeito da estrutura de um material (Kumar et al., 2011). É um método que utiliza a região do visível e infravermelho próximo do espectro eletromagnético,

que compreende a faixa entre 700 nm e 2500 nm. Porém, na maioria das análises, as técnicas utilizam entre 1100 nm e 2500 nm (Deepa et al., 2016).

O princípio da análise do NIRS consiste na utilização de diferentes comprimentos de onda do infravermelho próximo e avaliação do comportamento de absorção e dispersão da luz no material em questão, para desta forma, obter conhecimento dos componentes moleculares presentes na amostra (Lima e Bakker, 2011). O espectro gerado é como uma impressão digital da amostra (Deepa et al., 2016).

São diversas as pesquisas realizadas com o intuito de viabilizar o uso do NIRS na indústria alimentícia, humana e animal, principalmente para caracterizar um alimento, quantificar nutrientes, detectar fraudes, avaliar a qualidade de um produto, presença de toxinas, e inclusive, determinar o grau de oxidação de gorduras e óleos e seu perfil de ácidos graxos (Yildiz et al., 2002; Yildiz et al., 2003; Pimenta et al., 2003; Prieto et al., 2009).

Como visto anteriormente, a grande maioria dos métodos utilizados para determinar o estágio oxidativo de um alimento ou óleo/gordura, demanda quantidades consideráveis de reagentes, mão de obra qualificada, tempo para que as análises sejam concluídas, além de não permitir a reutilização da amostra do material analisado. Todas estas variáveis tornam o processo caro e inacessível para a indústria (Yildiz et al., 2003; Cozzolino et al., 2005).

Apesar do custo inicial de aquisição do equipamento NIRS ser relativamente alto, existem muito mais vantagens em utilizá-lo do que permanecer com técnicas tradicionais em laboratório. Para a validação do método, no entanto, é necessário o desenvolvimento e validação de curvas de calibração para o parâmetro o qual se deseja analisar. Alguns passos são seguidos: selecionar o tipo de amostra a ser analisado (é necessária grande variabilidade), realizar as análises laboratoriais de excelente qualidade para o parâmetro desejado e adquirir os resultados, realizar as leituras espectrais, submeter os espectros obtidos na leitura a tratamentos matemáticos, determinar as equações e finalmente validar a curva de calibração (Gontijo et al., 2009).

Na indústria *petfood*, atualmente o NIRS tem sido empregado com maior frequência no controle de qualidade de matérias-primas e produto acabado, para estimar a composição nutricional. Tendo em vista que para ingredientes de origem animal, o controle da oxidação é um dos principais parâmetros de qualidade a se avaliar, é possível que a elaboração de curvas de calibração para estes parâmetros em farinhas e

óleos sejam de grande valia para o controle de qualidade na indústria, acelerando o fluxo de matérias-primas na fábrica.

Referências Bibliográficas

Alam, N.J. Bristi, M. Rafiquzzaman, 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal 21, 143-152.

Angelo, P.M., Jorge, N., 2007. Compostos fenólicos – uma breve revisão. Rev. Inst. Adolfo Lutz 66 (1), 1-9.

Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analys*, 127, 183-198.

Barriuso, B., Astiasarán, I., Ansorena, D., 2013. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *Eur. Food Res. Technol.*, 236, 1-15.

Bellaver, C., Zanotto, D.L., 2016. Parâmetros de qualidade em gorduras e subprodutos protéicos de origem animal.
https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/parametros_qualidade_gorduras_e_subprodutos_proteicos_de_origem_animal_000fyrf0t6n02wx5ok0pvo4k33hlhtkv.pdf
(acesso em 30.03.16).

Bernheim, F., Bernheim, M.L.C., Wilbur, K.M., 1948. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. *J. Biol. Chem.*, 174, 257-264.

Bradshaw, J.W.S., Healey, L.M., Thorne, C.J., Macdonal, D.W., Ardenclark, C., 2000. Differences in food preferences between individuals and populations of domestic cats *Felis silvestris catus*. *Applied Behavior Science*, 68, 257-268.

Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.

Case, L.P., 2011. Canine and feline nutrition: a resource for companion animal professionals. Evaluation of pet foods, third ed. Mosby Elsevier, Maryland Heights.

Choe, E., Min, D.B., 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive reviews in food Science and food safety*, 5, 169-186.

Colakoglu, A.S., 2007. Oxidation kinetics of soybean oil in the presence of monoolein, stearic acid and iron *Food Chemistry*, 101, 724-728.

Cozzolino, D., Murray, I., Chree, A., Scaife, J.R., 2005. Multivariate determination of free fatty acids and moisture in fish oils by partial least-squares regression and near-infrared spectroscopy. *LWT*, 38, 821-828.

Deepa, K., Senthilkumar, S., Kalpana, K., Suganya, T., Sasikumar, P., Thirumalaisamy, G., Sureshkumar, R., Vasanthakumar, P., 2016. NIRS in animal Sciences. *International Journal of Science*, 5, 605-610.

Dobarganes, M.C., Velasco, J., 2002. Analysis of lipids hydroperoxides. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 104, 420-428.

Frankel, E.N., 1991. Recent advances in lipid oxidation. *J. Sci. Food Agric.*, 54, 495-511.

Frankel, E.N., 2012. *Lipid oxidation*, second ed. Woodhead Publishing, Philadelphia.

Gontijo, M.M.N., Simeone, M.L.F., Guimarães, C.C., Vasconcelos, F.V., Uba, M.A., 2009. Predição de proteína, matéria seca e fósforo em grãos de milho pela espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo, first ed. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas.

Green, A.S., Ramsey, J.J., Villaverde, C., Asami, D.K., Wei, A., Fascetti, A.J., 2008. Cats are able to adapt protein oxidation to protein intake provided their requirement for dietary protein is met. *The Journal of Nutrition*.

Gray, J.I., 1978. Measurement of lipid oxidation: a review. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 55 539-546.

Gross, K.L., Bollinger, R., Thawngmung, P., Collings, G.F., 1994. Effect of three different preservative systems on the stability of extruded dog food subjected to ambient and high temperature storage. *The Journal of Nutrition*, 2638- 2642.

Gülçin, I., 2012. Antioxidant activity of food constituents: a review. *Arch. Toxicol.*, 86 345-391

Halliwel, B., Aeschbach, R., Löliger, J., Aruoma, O.I., 1995. The characterization of antioxidants. *Fd Chem. Toxic.*, 33, 601-617.

Hoyland, D.V., Taylor, A.J., 1991. A review of the methodology of the 2-thiobarbituric acid test. *Food Chemistry*, 40, 271-291.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015. População de animais de estimação no Brasil – 2013 – em milhões.

http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_tematicas/Insumos_agropecuarias/79RO/IBGE_PAEB.pdf (acesso em 30.03.16)

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015 (1). Produção agropecuária - Abate, leite, couro e ovos.

http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201404_publ_completa.pdf (acesso em 30.03.16)

Kahl, R., 1984. Synthetic antioxidants: biochemical actions and interference with radiation, toxic compounds, chemical mutagens and chemical carcinogens. *Toxicology*, 33, 185-228.

Kohn, H.I., Liversedge, M., 1944. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine and menadione. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 292-300.

Kumar, D.S., Aenugu, H.P.R., Parthiban, N., Ghosh, S.S., Banji, D., 2011. Near infrared spectroscopy – an overview. *Int. J. ChemTech Res*, 3, 825-836.

Lima, E.S., Abdalla, D.S.P., 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 37, 293-303.

Lima, A., Bakker, J., 2011. Espectroscopia do infravermelho próximo para a monitoração da persufão tecidual. *Rev. Bras. Ter. Intensiva*, 23, 341-351.

Medina-Meza, I.G., Barnaba, C., Barbosa-Cánovas, G.V., 2014. Effects of high pressure processing on lipid oxidation: a review. *Innovative food Science and emerging Technologies*, 22, 1-10.

Osawa, C.C., Gonçalves, L.A.G., Ragazzi, S., 2008. Evaluation of the quality of pet foods using fast techniques and official methods. *Ciên. Tecnol. Aliment.*, 28, 223-230.

Pet Brasil, 2016. Mercado Brasileiro.

<http://www.petbrasil.org.br/mercado-brasileiro> (acesso em 30.03.16)

Pitaro, S., Fiorani, L., Jorge, N., 2012. Antioxidant activity of basil and oregano extracts added to soybean oil for accelerated storage test. *Journal of Food Biochemistry*.

Pokorný, J., 2007. Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidants? *Eur. J. Sci. Technol.*, 109, 629-642.

Prieto, N., Roehe, R., Lavín, P., Batten, G., Andrés, S., 2009. Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: a review. *Meat Science*, 83, 175-186.

Ramalho, V.C., Jorge, N., 2006. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim. Nova*, 29, 755-760.

Shahidi, F., 2000. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*, 44, 158-163.

Shahidi, F., Zhong, Y., 2005. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products – Lipid Oxidation: measurement methods*, sixth ed. John Wiley & Sons, Newfoundland.

Stasiak, M., 2002. The development of food preferences in cats: the new direction. *Nutritional Neuroscience*, 5, 221-228.

Silva, F.A.M., Borges, M.F.M., Ferreira, M.A., 1999. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Quim. Nova*, 22, 94-103.

Tian, F., Decker, E.A., Goddard, J.M., 2013. Controlling lipid oxidation of food by active packaging Technologies. *Food. Funct.*, 4, 669-680.

United States Department of Agriculture, 2015. *Livestock and Poultry: World markets and trades*.

http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.PDF (acesso em 30.03.16)

Yildiz, G., Wehling, R.L., Cuppett, S.L., 2002. Monitoring PV in corn and soybean oils by NIR spectroscopy. *JAOCS*, 79, 1085-1089.

Yildiz, G., Wehling, R.L., Cuppett, S.L., 2003. Comparison of four analytical methods for the determination of peroxid value in oxidized soybean oils. *JAOCS*, 103-107.

Zaghini, G., Biagi, G., 2005. Nutritional peculiarities and diet palatability in the cat. *Veterinary Research Communications*, 29, 39-44.

II. OBJETIVOS GERAIS

Neste trabalho objetivou-se:

- Avaliar as alterações oxidativas ocorridas na gordura de aves pela utilização dos principais métodos convencionais de análises empregados atualmente: índice de peróxido; acidez em NaOH, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e dienos conjugados;
- Determinar o shelf-life da gordura de aves estabilizada com diferentes níveis de BHT ou uma associação de BHA+BHT;
- Elaborar curvas de calibração por Espectrofotometria de Reflectância no Infra-Vermelho Próximo (NIRS) para o controle oxidativo da gordura de aves;
- Avaliar a perda do valor nutricional e a palatabilidade da gordura de aves durante o processo para gatos durante o processo de oxidação;
- Comparar o método de estufa para aceleração da oxidação lipídica com os resultados obtidos a temperatura ambiente, visando fazer uma correspondência de tempo entre estes dois métodos.

III. *Shelf-life* da gordura de aves com diferentes níveis de antioxidantes sintéticos

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de estabilização de cinco níveis (50; 101,26; 225; 348,74 e 400 ppm) de dois tipos de antioxidantes sintéticos, BHT puro e um mix de BHA e BHT, em gordura de aves. Uma amostra controle (sem adição de estabilizantes) também foi utilizada no estudo e mantida em estufa e em temperatura ambiente. Todas as amostras foram colocadas em estufa a 60°C por 240 horas. Alíquotas foram retiradas de tempos em tempos e congeladas para futuras análises. Foram realizados os testes de IA, IP, TBARS, Dienos Conjugados, Oxitest, CGS e HPLC, além de um estudo de palatabilidade em gatos adultos. Foram também feitas curvas de calibração para qualidade de gordura por NIRS. TBARS e IP mostraram ser os métodos convencionais que apresentam resultados mais coerentes entre si. Neste estudo foi possível verificar que 0,22 µM de equivalente de MDA e 10 mEq de peróxido são valores limítrofes para a qualidade da gordura de frango. Além disso, Oxitest se mostrou um método eficaz nos estudos de *shelf-life* com antioxidantes sintéticos. Para a gordura controle negativo deste estudo, cada hora em estufa correspondeu a cerca de 0,74 dias de estocagem a temperatura ambiente. Os valores de R² para TBARS e IP das curvas de calibração do NIRS, foram de 0,9988 e 0,9954 respectivamente, o que confere aos métodos, excelente capacidade preditiva. As doses mínimas de BHA+BHT e BHT necessárias para estabilizar a gordura deste estudo por pelo menos 100 dias foram de 390 e 200 ppm, respectivamente. Também foi possível concluir, através deste estudo, que gatos são sensíveis em detectar a presença de peróxidos em alimentos, porém quando em baixas concentrações, o IP não influencia no consumo desta categoria animal. Os animais mostraram recusa pelo alimento quando o valor de IP era superior a 5 mEq/kg. No entanto, devido as perdas significativas de ácidos graxos essenciais ao longo do processo oxidativo da gordura e a formação de substâncias tóxicas, não é recomendado o uso de gordura de aves oxidada para gatos.

Palavras-chave: estabilizantes, gatos, gordura de aves, oxidação, pet food, palatabilidade

Abstract

The aim of this study was to evaluate the stability capacity of five different levels (50, 101.26, 225, 348.74 and 400ppm) of two different synthetic antioxidants, BHT and BHA/BHT mix, in poultry fat. A negative control sample was also used in this study and maintained in the oven and at room temperature. All samples were stored in oven at 60°C during 240 hours, and smaller samples were collected at previous established periods, and frozen for future analysis. The tests performed were FFA, PV, TBARS, Dienes, Oxitest, CGS, HPLC and palatability tests in adults cats. We also made calibration curves for fat quality by NIRS. TBARS and PV showed to be conventional methods that had high correlation between each other. In this study, it was verified that 0.22 μM of MDA equivalent and 10 mEq of peroxide are limiting values for the quality of poultry fat. The values of R^2 for TBARS and PV on the calibration curves of NIRS were 0.9988 and 0.9954, respectively. These results show that these methods have an excellent predictive capacity. Also, in this study, for the negative control sample, each hour in oven corresponded to 0.74 days of storage at room temperature. The minimal doses of both antioxidants used in our research, BHA+BHT and pure BHT to guarantee a 100-day-storage were 390 and 200 ppm, respectively. It's also possible to conclude that cats are sensible at detecting peroxides in food but when in low quantities, it does not interfere on the food intake. The animals showed repulse for the food when the value of PV was superior of 5 mEq/kg. However, due to the loss of essential fatty acids and formation of toxic products, the use of rancid ingredients is not recommended.

Key words: cats, chicken fat, oxidantion, palatability, petfood, preservatives

1. Introdução

Com o crescimento da população de animais de companhia no Brasil, a indústria pet vem ganhando grande espaço no mercado, sendo responsável pelo faturamento de 16 bilhões de reais no ano de 2014 (PetBrasil, 2016). Devido a grande preocupação das pessoas com seus animais de estimação, a procura por alimentos de qualidade, que promovam a saúde, aumentou consideravelmente nos últimos anos.

As gorduras e óleos têm como principal papel fornecer energia, ácidos graxos (AG) essenciais e funcionais, além de melhorar a atratividade do produto e serem fundamentais na absorção de vitaminas lipossolúveis (Case, 2011; Tian et al., 2013). Dentre as fontes de gorduras mais utilizadas na produção de alimentos para cães e gatos, está a gordura de aves (Case, 2011).

Um grande problema que a indústria alimentícia enfrenta com óleos e gorduras, é a oxidação lipídica, responsável pela deterioração do produto, com a consequente perda de AG essenciais e produção de substâncias tóxicas, além do desenvolvimento de *off-flavor* e *off-odors*, que podem comprometer a palatabilidade e aceitabilidade do alimento (Gray, 1977; Choe e Min, 2006; Medina-Meza et al., 2014). O processo oxidativo se dá por meio da autooxidação, fotooxidação, termoxidação e oxidação enzimática, sendo a autooxidação, a mais comum e inevitável (Shahidi, 2015).

Para a avaliação do estágio oxidativo de uma determinada amostra de alimento, diversos métodos foram desenvolvidos ao longo dos anos. Sendo que devido ao grau de complexidade do processo de oxidação lipídica se faz necessária, uma combinação de métodos físico-químicos que assegurarão a qualidade e confiabilidade da fonte de lipídios analisada (Barriuso et al., 2012).

Dentre os diversos métodos conhecidos atualmente, e largamente utilizados, estão o Índice de Acidez (IA), que mede a quantidade de AG livres ou totais em uma amostra; o Índice de Peróxido (IP), responsável por quantificar indiretamente os hidroperóxidos, produtos primários da oxidação; o TBARS, método clássico que por espectrofotometria, quantifica indiretamente produtos secundários da oxidação (aldeídos, cetonas, álcoois, entre outros), e Dienos Conjugados, que determina também produtos primários da oxidação, especialmente formados a partir da doação de elétrons do antioxidante para o AG que sofreu oxidação (Antolovich et al., 2002; Dobarganes e Velasco, 2002; ; Shahidi e Zhong, 2005; Barriuso et al., 2013; Osawa et al., 2013).

Para a estabilização de uma fonte lipídica, ou alimento rico em lipídios, são utilizados antioxidantes. Um antioxidante é, por definição, uma substância que em baixas concentrações é capaz de atrasar ou inibir a oxidação lipídica de um substrato em que está presente (Halliweel et al., 1995). São classificados em antioxidantes primários e secundários, sendo os primários também conhecidos como bloqueadores, responsáveis por inibir o início da autoxidação, e a propagação da mesma (Antolovich et al., 2002; Pokorny, 2007; Tian et al., 2013).

Dentre os mais conhecidos e mais utilizados entre os antioxidantes bloqueadores, estão os compostos sintéticos, butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT) (Carocho e Ferreira, 2013; Tian et al., 2013). Apesar de amplamente utilizados, existem regulamentações quanto as quantidades a serem adicionadas ao alimento, pois há dúvidas com relação a sua toxicidade e possível efeito carcinogênico (Gülçin, 2012; Carocho e Ferreira, 2013).

Para se medir a capacidade antioxidante de um composto, são geralmente utilizados métodos de aceleração do processo de oxidação, que se valem de altas temperaturas e/ou pressão, como o Método de Schaal, Rancimat e Oxitest, métodos colorimétricos como DPPH, análises de fluorescência como o ORAC, entre outros (Alam et al., 2013).

Devido ao alto custo para análises, necessidade de mão de obra especializada, desperdício de amostra, materiais e reagentes, e períodos prolongados para se obter resultados, a Espectroscopia de Reflectância no Infravermelho Próximo (NIRS), surge como alternativa, principalmente para a indústria (Yilds et al., 2003; Cozzolino et al., 2005). O NIRS é um método espectroscópico vibracional baseado nos *overtones* moleculares e combinações de vibrações C-H, O-H e N-H, sendo capaz de dar informações a respeito da estrutura de um material (Kumar et al., 2011). É um método que utiliza a região do infravermelho próximo do espectro eletromagnético, que compreende a faixa entre 700nm e 2500nm para avaliar o comportamento de absorção e dispersão da luz no material em questão, para desta forma, obter conhecimento dos componentes moleculares presentes na amostra.

Neste trabalho objetivou-se: avaliar o *shelf-life* de gordura de aves preservada com cinco níveis de BHT ou uma associação de BHA+BHT; comparar o *shelf-life* da gordura de aves mantida em estufa a 60°C com aqueles obtidos à temperatura ambiente e estabelecer correspondência entre estes tempos; avaliar a palatabilidade de alimentos para gatos contendo gordura em diferentes estágios oxidativos; elaborar curvas de

calibração de NIRS para diferentes parâmetros utilizados para avaliar a qualidade de gordura; determinar as modificações ocorridas nas análises de IA, IP, TBARS e dienos conjugados durante o processo oxidativo da gordura de aves.

2. Materiais e Métodos

A gordura de aves foi produzida no curtume da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), localizada na cidade de Maringá, estado do Paraná. As análises foram conduzidas no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal (LANA) e Laboratório de Espectroscopia e Cromatografia, ambos pertencentes ao Departamento de Zootecnia da UEM.

2.1. Produção da Gordura de Aves

A maioria das fábricas de farinhas no Brasil opta por adicionar antioxidantes diretamente na matéria-prima, para, desta forma, evitar a rápida oxidação da mesma. Por esta razão, neste estudo, optou-se por confeccionar a gordura, garantindo desta forma que não haveria nenhum residual de antioxidantes, previamente adicionados.

Para isto foram adquiridas peles de frango de uma indústria local, e estas foram armazenadas em freezer a -18°C até o momento de extração da gordura. No dia da produção, as peles foram previamente moídas em moinho de facas, providos de peneira de 8mm e em seguida cozidas sob pressão, seguindo-se a razão de 1:1 de pele e água destilada. As amostras foram cozidas por 40 minutos a partir da estabilização da temperatura, a qual foi mantida em aproximadamente 97°C .

Após esta etapa, a pele cozida foi peneirada em malha fina de nylon 150 fios, para que fosse separada a parte sólida da parte líquida, constituída principalmente por colágeno, água e gordura. O líquido resultante foi acondicionado em recipientes, e colocados em repouso à temperatura ambiente para o resfriamento e para que ocorresse a separação de fases por decantação. Após respeitado o período de decantação, de aproximadamente 24 horas, a camada superior de gordura foi recolhida e levada ao laboratório, em que foram aplicados os tratamentos e imediatamente separadas as amostras e colocadas em estufa a 60°C para a determinação do *shelf-life*.

2.2. Aplicação dos tratamentos da gordura e acondicionamento em estufa

No mesmo dia da coleta da gordura produzida, foi determinado o IP, a fim de garantir que o produto não estava em estágio avançado de oxidação. Em seguida, foram feitas as estabilizações com dois diferentes antioxidantes sintéticos, em cinco diferentes níveis (50; 101,26; 225; 348,74 e 400 mg/kg). Os antioxidantes sintéticos empregados foram o BHT grau analítico puro (BHT ACS, 99,8 %, Labsynth, Brasil) e uma mistura comercial de BHT e BHA em proporção de 210 e 220 g/kg, respectivamente denominada BHA+BHT, tendo o citrato de sódio como sinergista (Antiox AV, Alltech do Brasil, Brasil).

Os antioxidantes foram adicionados diretamente na gordura que foi homogeneizada manualmente com auxílio de bastão de vidro, por 10 minutos para completa dissolução do antioxidante. Foi mantida uma amostra controle negativo, sem a adição de qualquer antioxidante à temperatura ambiente e em estufa.

Seguindo-se o Teste de Estufa de Schaal (Antolovich et al., 2002), todas as amostras foram armazenadas em potes plásticos transparentes fechados com tampas rosquiáveis e colocados em Estufa de Ventilação Forçada a 60°C, ao abrigo de luz, em que permaneceram por 10 dias, totalizando 240 horas. Diariamente, era feita a homogeneização manual de cada um dos recipientes, e as embalagens eram trocadas de lugar na estufa para que não houvesse influência do local onde eram colocadas.

2.3. Coleta de amostras e acondicionamento para as análises

Para a coleta das amostras que seriam analisadas, visando reduzir o número de análises laboratoriais, previamente ao experimento foi definida uma amostragem com o apoio do *software* estatístico Design Expert 7 (Stat-Ease Inc.), de acordo com Claus et al. (2015). Foram estabelecidos e fixados dois fatores de relevância, os níveis dos antioxidantes sintéticos e o momento de coleta da estufa para as análises laboratoriais. O programa gerou 12 experimentos para cada antioxidante, de acordo com a descrição na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência de experimentos gerados pelo programa estatístico Design Expert 7.

BHA+BHT (mg/kg)	Estufa (horas)	BHT (mg/kg)	Estufa (horas)
225,00	48,00	225,00	48,00
101,26	76,12	101,26	76,12

348,74	76,12	348,74	76,12
50,00	144,00	50,00	144,00
225,00	144,00	225,00	144,00
225,00	144,00	225,00	144,00
225,00	144,00	225,00	144,00
225,00	144,00	225,00	144,00
400,00	144,00	400,00	144,00
101,26	211,88	101,26	211,88
348,74	211,88	348,74	211,88
225,00	240,00	225,00	240,00

Em cada um dos momentos estabelecidos pelo *software*, foram recolhidos cerca de 50 gramas das amostras, e estas eram colocadas em frascos de vidro âmbar de 20 mL. Nitrogênio Gasoso foi adicionado no interior dos frascos, que logo em seguida foram hermeticamente fechados, etiquetados, envoltos em papel alumínio e levados ao freezer a -18°C , e permaneceriam até o momento das análises.

Uma amostra de gordura controle, sem adição de nenhum tipo de antioxidante, foi mantida à temperatura ambiente por 7 meses. Esta amostra foi armazenada no escuro, e a cada 30 dias, foi realizada a análise de IP. O objetivo desta etapa do trabalho, foi comparar o grau de oxidação de uma amostra à temperatura ambiente, comparada à que sofreu a ação de alta temperatura e desta forma estabelecer a relação entre horas em estufa a 60°C e dias em temperatura ambiente. Isso porque, acredita-se que os mecanismos da oxidação se alteram quando na presença de altas temperaturas (Antolovich et al., 2012).

2.4. Índice de Peróxido

Para as análises do IP em gordura de aves foi utilizado o método oficial Cd8-53 da The American Oil Chemists' Society (AOCS).

Foram pesados 5 gramas de gordura de frango em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Com o auxílio de proveta graduada, foram adicionados 30 mL de uma solução 3:2 de ácido acético e clorofórmio à gordura, que foi colocada em agitador magnético por 10 minutos. Passado o tempo de agitação, foram adicionados 0,5 mL de uma solução de iodeto de potássio à solução, que foi imediatamente colocada no escuro por 1 minuto. Por fim, foram adicionados 30 mL de água destilada e 1 mL de solução 1 % de amido, e

a solução titulada com solução de Tiosulfato de Sódio 0,01 N, até que a coloração azul desaparecesse.

O volume de Tiosulfato de Sódio gasto na titulação de cada amostra foi anotado e feito os cálculos do índice de peróxido através da seguinte fórmula:

$$\text{Índice de Peróxido} = \frac{(V - Vb) \times N \times F \times 1000}{P}$$

Em que:

V: Volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra

Vb: Volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco

N: Normalidade da solução de Tiosulfato de sódio = 0,01

F: Fator de correção do Tiosulfato de Sódio = 1,26

P: Peso da amostra de gordura de aves

2.5. Índice de Acidez

Para a determinação do IA das amostras, foi utilizado o método oficial Cd5-40 da AOCS.

Foram pesados 2 gramas de amostra de gordura de frango em frasco Erlenmeyer de 125 mL e então adicionados 25 mL de uma solução éter-álcool (2:1). Como indicador, foram adicionadas 2 gotas de solução de Fenolfetaleína à solução, e em seguida, a mesma foi titulada com solução de Hidróxido de Sódio 0,01 M, até o desaparecimento da coloração rósea.

O volume de Hidróxido de Sódio gasto na titulação de cada amostra foi anotado e feito os cálculos através da seguinte fórmula:

$$\text{Índice de Acidez} = \frac{V \times F \times 5,61}{P}$$

Em que:

V: Volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra

F: fator de correção = 1,40

P: Peso da amostra de gordura de aves

2.6. TBARS

O método utilizado para realizar o teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi adaptado de Ke & Woyewoda (1979). A quantidade de amostra utilizada para a análise foi modificada, sendo que ao invés de 15-20 mg como recomendado, para este trabalho, foram utilizadas 100 mg. Os critérios de mudança foram tomados com base no trabalho de Semb (2012).

2.7. Dienos Conjugados

Para o teste de dienos conjugados foi realizada uma modificação do método IUPAC 2.505. Para isto, 10 mL de uma solução 2:1 de isooctano/2-propanol foi adicionada a 5 µg de amostra, e agitada em vortex por 60 segundos. A solução foi filtrada em filtros de membrana do tipo PTFE (25 mm, poro 0,2 µm) e então realizada a leitura da absorbância a 232 nm em espectrofotômetro (PC 300 Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

2.8. Oxitest

Para o teste de *shelf-life* foi utilizado o equipamento denominado Oxitest (Velp Scientifica, Usmate, Alemanha). O método escolhido foi o descrito por Claus et. al (2015), utilizando 5 gramas de cada amostra.

2.9. Determinação do perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos da gordura de frangos sem adição de antioxidantes foi traçado utilizando o método de Hartman e Lago (1973). Foram utilizados 100 mg de amostra, que passou por catálise básica com soda cáustica e metanol e catálise ácida com ácido sulfúrico e metanol, cada uma com tempo de reação por cinco minutos, em lavadora ultrassônica (Eco Sonics - Ultronique) (Figueiredo et al., 2016). Logo após,

isooctano foi adicionado à amostra e pipetou-se a fase superior, que foi guardada em vial (Figueiredo et al., 2016).

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos (EMAG) foram separados em cromatógrafo a gás (Thermo, trace ultra 3300), equipado com detector de ionização em chama e coluna capilar de sílica fundida CP – 7420 (Select Fame, 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de cianopropil). As vazões dos gases foram de 1,2 mL/min para o gás auxiliar (N₂) e 35 e 350/min para o H₂ e para o ar sintético, respectivamente, para a chama do detector. O volume injetado foi de 2,0 µL, utilizando divisão da amostra (*Split*) de 1:80. As temperaturas do injetor e do detector foram de 240°C. A temperatura da coluna foi programada a 165°C durante 7,00 min, seguido por rampa de aquecimento de 4°C/min até atingir 185°C, permanecendo assim por 4,67 min, seguido por nova rampa de aquecimento de 6°C/min até que a coluna atingisse 235°C, mantidos por 5,00 min, totalizando assim 30,00 min de análise. Os tempos de retenção e as áreas dos picos dos EMAG foram determinados utilizando o *software* ChromQuest 5.0.

Os ácidos graxos foram identificados a partir da comparação de seus tempos de retenção com padrões de composição conhecida (SIGMA, USA).

A quantificação absoluta dos EMAG foi realizada por padronização interna, utilizando como padrão o metil éster do ácido tricosanoico (23:0) (SIGMA, USA). Fatores de correção teóricos foram empregados para a determinação dos valores de concentrações. A quantidade de ácidos graxos nas amostras foi calculada em mg de ácido graxo/100 g de amostra utilizando a Equação 1.

$$M_x = \frac{A_x M_P F_{CT}}{A_P M_A F_{CEA}} \times 100 \quad (1)$$

Em que M_x é a concentração do ácido graxo X em mg de ácido graxo/100 g de amostra, A_x é a área do pico do ácido graxo X, A_P é a área do pico do padrão interno (23:0), M_P é a massa de padrão interno adicionada à amostra em mg, M_A é a massa da amostra em g, F_{CT} é o fator de correção teórico do detector de ionização em chama (DIC) e F_{CEA} é o fator de conversão de éster metílico para ácido graxo.

2.10. Quantificação das perdas de BHT

A extração dos antioxidantes na gordura foi realizada de acordo com o método 983.15 da AOAC.

As análises cromatográficas para se quantificar as perdas dos antioxidantes sintéticos adicionados à gordura de aves foram realizadas empregando cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Alliance Waters modelo e2695, equipado com módulo de separação, bomba quaternária e detector de fotoiodo. Foi empregada uma coluna ACE 3, C18-AR, 150 mm x 4,6 mm i.d.

A eluição foi realizada em modo isocrático com os solventes: 20 % solvente A (Água 2% Ácido acético) e 80 % solvente B (Metanol a 100 %). A faixa para monitoramento dos picos de BHT compreendia entre 210 e 400 nm, e o volume injetado foi de 10 µL. Para a quantificação, foi necessária a construção de curvas analíticas. Foram então preparadas soluções de trabalho diluídas em metanol com as seguintes concentrações de BHT: 60, 80, 100 e 120 µg/mL.

O pico do BHT, caracteriza-se por apresentar a extensão de 278,8 nm (Figura 7). De acordo com a padronização do método, quando utilizando BHT puro, o tempo de retenção do mesmo, ou seja, o surgimento do pico deste antioxidante (Figura 8) aconteceu aos 31,4 minutos (Tabela 2).

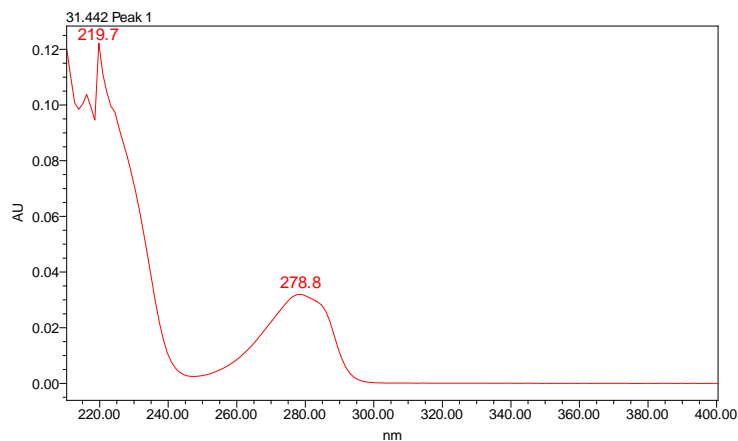


Figura 7. Espectro UV de BHT

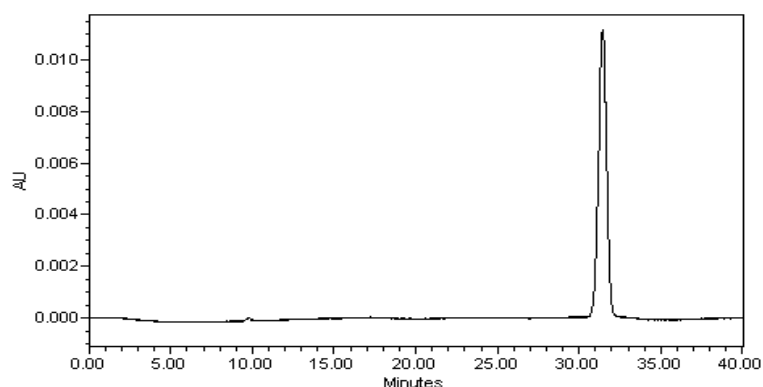


Figura 8. Cromatograma a 280nm

A curva de calibração foi satisfatória com R^2 igual a 0,9989 (Figura 9).

Tabela 2. Dados utilizados para a elaboração da curva de calibração de BHT.

Concentração ^a µg/mL	TR ^b (min)	Area
60	31,4	275889,2
80	31,4	378579,2
100	31,4	484268,1
120	31,4	602519,4

^a Concentração de BHT puro dissolvido em metanol

^b Tempo de retenção

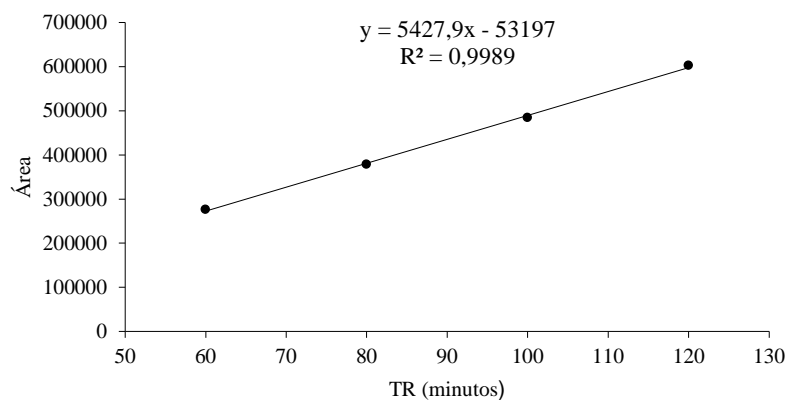


Figura 9. Curva de calibração para quantificação de BHT

2.11. Palatabilidade da gordura de aves em diferentes estágios de oxidação em gatos

O objetivo do teste de palatabilidade foi verificar se gatos apresentam percepção organoléptica aos alimentos com baixos níveis de peróxido e se o consumo do alimento é afetado nestas condições. Foram então, preestabelecidos níveis de peróxido na gordura de aves, que seria adicionada ao alimento extrusado, sendo estas faixas de peróxido:

- T-0 (0-5 mEq/kg)
- T-10 (5-15 mEq/kg)
- T-20 (15-25 mEq/kg)
- T-40 (25-45 mEq/kg)
- T-80 (75-85 mEq/kg)

No dia da produção da gordura de aves, cerca de 1kg de amostra foi separado, e estabilizado com 200 ppm de BHT (BHT ACS, 99,8 %, Labsynth, Brasil). Foi realizado o teste IP para verificar o estágio de oxidação da amostra. O restante da gordura, não estabilizada com antioxidantes, foi acondicionado em dois béckers de vidro de 2 litros de capacidade cada, e estes, colocados em estufa de ventilação forçada a 60°C. A cada dois dias, eram realizados testes de IP para observar o processo oxidativo da gordura.

Assim que a gordura atingia os níveis de peróxido preestabelecidos, amostras de 1 kg eram retiradas da estufa, e estabilizadas com 200 ppm de BHT e acondicionadas em recipientes fechados de vidro, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, a fim de manter o nível do peróxido, até sua futura adição na ração, para o teste de palatabilidade.

Um alimento comercial para gatos adultos (Special Cat Gatos Adultos, Manfrim Agroindustrial SA, Brasil), desengordurado foi adquirido de empresa local. A gordura em diferentes níveis de peróxido foi então adicionada às amostras deste alimento, de forma a compor 5 % do peso total, juntamente com 2% de palatilizante, ambos por cobertura.

O teste de palatabilidade foi realizado no Centro de Estudos e Ensino em Nutrição de Felinos (CEENUFEL), pertencente à Universidade Estadual de Maringá. Os resultados foram obtidos em duas diferentes condições, com os animais confinados em gaiolas individuais para a alimentação, visando obter os resultados individualizados ou com os animais em gatil coletivo, com alimento disponível à vontade sem o confinamento dos animais, visando manter as características naturais de consumo de alimentos pelos gatos. O alimento foi oferecido em quantidades que excediam às exigências diárias de energia pelos animais (90 g/animal/dia). As cores e tamanho das vasilhas eram iguais, com a finalidade de se eliminar a possibilidade de qualquer interferência por fatores que não fossem a ração. Os desafios seguiram o esquema descrito na Tabela 3, tanto no gatil coletivo quanto nas giolas individuais.

Tabela 3. Desafios de preferência alimentar em gatil coletivo (n=20) e em gaiolas individuais (n=20), de alimentos contendo diferentes índices de peróxido para gatos.

Desafios	Dieta A	Dieta B
1	Controle	T-10
2	Controle	T-20
3	Controle	T-40
4	Controle	T-80
5	T-10	T-40
6	T-20	T-80

Teste em gaiolas individuais: Teste com duas vasilhas (A e B), cada uma contendo um tipo de tratamento, em gaiolas individuais, para análise de primeira escolha e consumo. O período experimental deste estudo foi de 4 horas para cada dupla de tratamentos, sendo a alimentação realizada por 2 horas durante a manhã e 2 horas durante a tarde. O lado dos comedouros A e B eram invertidos na refeição da tarde. A análise de primeira escolha era feita logo pela manhã, quando o animal era apresentado às duas vasilhas, simultaneamente, e anotava-se qual ele cheirava primeiro. O consumo era calculado ao fim do dia.

Teste em gatil coletivo: Teste com vasilhas contendo dois tratamentos diferentes em um espaço coletivo, para análise de consumo, sem a interferência de agentes estressantes, eventualmente causados pelo confinamento em gaiola. As vasilhas eram espalhadas no espaço coletivo, e os animais tinham acesso a elas por 2 horas durante a manhã e 2 horas durante a tarde. Ao fim do dia, era calculado o consumo.

A avaliação da palatabilidade foi feita pela razão de ingestão (RI), conforme a equação 2.

(2)

$$RI = \frac{\text{Ingestão Dieta A}}{(\text{Ingestão Dieta A} + \text{Ingestão Dieta B})}$$

Os dados foram transformados para raiz de x+1 para a análise de variância e comparados como dados pareados, considerando 5 % de probabilidade.

2.12. Curvas de calibração de parâmetros oxidativos na gordura de aves pelo NIRS

Todos os dias amostras de todos os tratamentos eram retiradas e congeladas para futuras leituras. As amostras foram submetidas todas à leitura pelo NIRS (NIRSystems,

marca FOSS Analytical, modelo 5500 Scanning, Estados Unidos) no mesmo dia. Para a elaboração das curvas de calibração foram usadas 68 amostras de gordura de frango, descongeladas e escaneadas a temperatura ambiente (entre 20°C e 24°C). As células do NIRS eram limpas com éter de petróleo, água morna destilada e detergente, secas e lustradas com flanela entre a leitura de uma amostra e outra. Após o escaneamento de todas as amostras, o banco de dados do *software* WinISI III Project Manager versão 1.5e (Foss NIRSystem Inc., Estados Unidos), foi alimentado com os valores de IA, IP, Dienos e TBARS obtidos em laboratório.

Todas as curvas de calibração foram elaboradas utilizando o modelo de regressão dos quadrados mínimos parciais (PLS).

2.13. Estatística

Todas as análises foram feitas em triplicata. As tabulações dos dados com os resultados do Oxitest, IP, IA, TBARS e Dienos foram feitas no programa Microsoft Office Excel, versão 2013. A análise de correlação de Pearson entre métodos foi realizada para se verificar a concordância dos resultados. Os dados obtidos dos tratamentos com antioxidantes sintéticos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a metodologia de superfície-resposta, através do programa estatístico Design Expert, versão 7.

Para a avaliação da RI dos alimentos nos desafios de palatabilidade, em gatil coletivo ou em gaiolas individuais, os dados foram submetidos à análise de variância e posteriormente submetidos ao Teste T Student, considerando-se 5 % de probabilidade.

Análise de regressão foi empregada para definir os modelos de evolução dos parâmetros oxidativos avaliados durante o *shelf-life* e as correspondências entre os métodos em estufa e a temperatura ambiente.

3. Resultados

3.1. Análise de dados referentes à gordura controle

Com a finalidade de se observar o *shelf-life* (vida de prateleira) da gordura de aves sem adição de antioxidantes (controle negativo), foram feitos gráficos de tendência

(Figura 10), o que possibilitou a visualização da relação entre a quantidade de horas da amostra em estufa e a oxidação lipídica ocorrida ao longo das 240 horas pré-estabelecidas.

Para Oxitest, IP (em estufa e temperatura ambiente) e TBARS, o modelo matemático que melhor se ajustou aos dados foi o Exponencial, enquanto para IA e Dienos, foi o Quadrático.

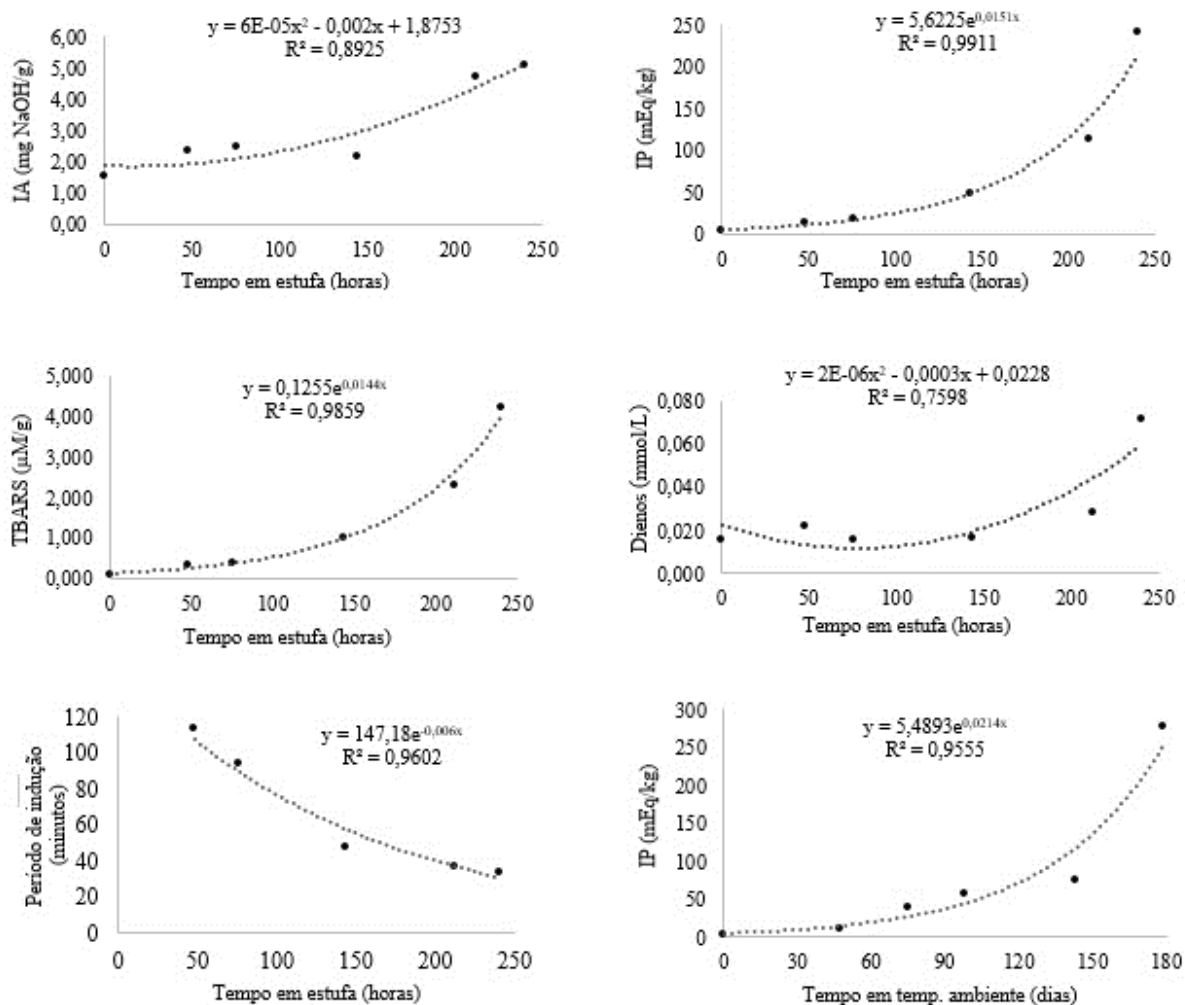


Figura 10. Curvas de Índice de Acidez (IA), Índice de Peróxido (IP), TBARS, Dienos Conjugados e Oxitest em estufa e IP à temperatura ambiente, em amostra de gordura de aves sem adição de antioxidantes.

Por meio dos gráficos de tendência da amostra controle, para as análises de IA, IP, TBARS, Dienos e Oxitest, é possível afirmar, que a gordura tende a sofrer maior oxidação lipídica conforme o tempo em estufa aumenta. Embora o IP quantifique principalmente os produtos primários da oxidação e TBARS, os produtos secundários (Barriuso et al., 2013), pode-se verificar que ambos apresentaram curvas muito

semelhantes, indicando que possivelmente existe rápida conversão dos produtos primários em produtos secundários durante o processo oxidativo.

As correlações mais fortes observadas entre os métodos foram entre as análises laboratoriais de TBARS e IP, e Dienes e IP, com coeficientes de determinação de 0,9949 e 0,9067, respectivamente (Figura 11). A correlação mais fraca foi observada entre IA e Dienes, com R^2 de 0,6492. Apesar disto, todos os métodos apresentaram uma relação linear crescente, indicando aumento com o tempo de estocagem.

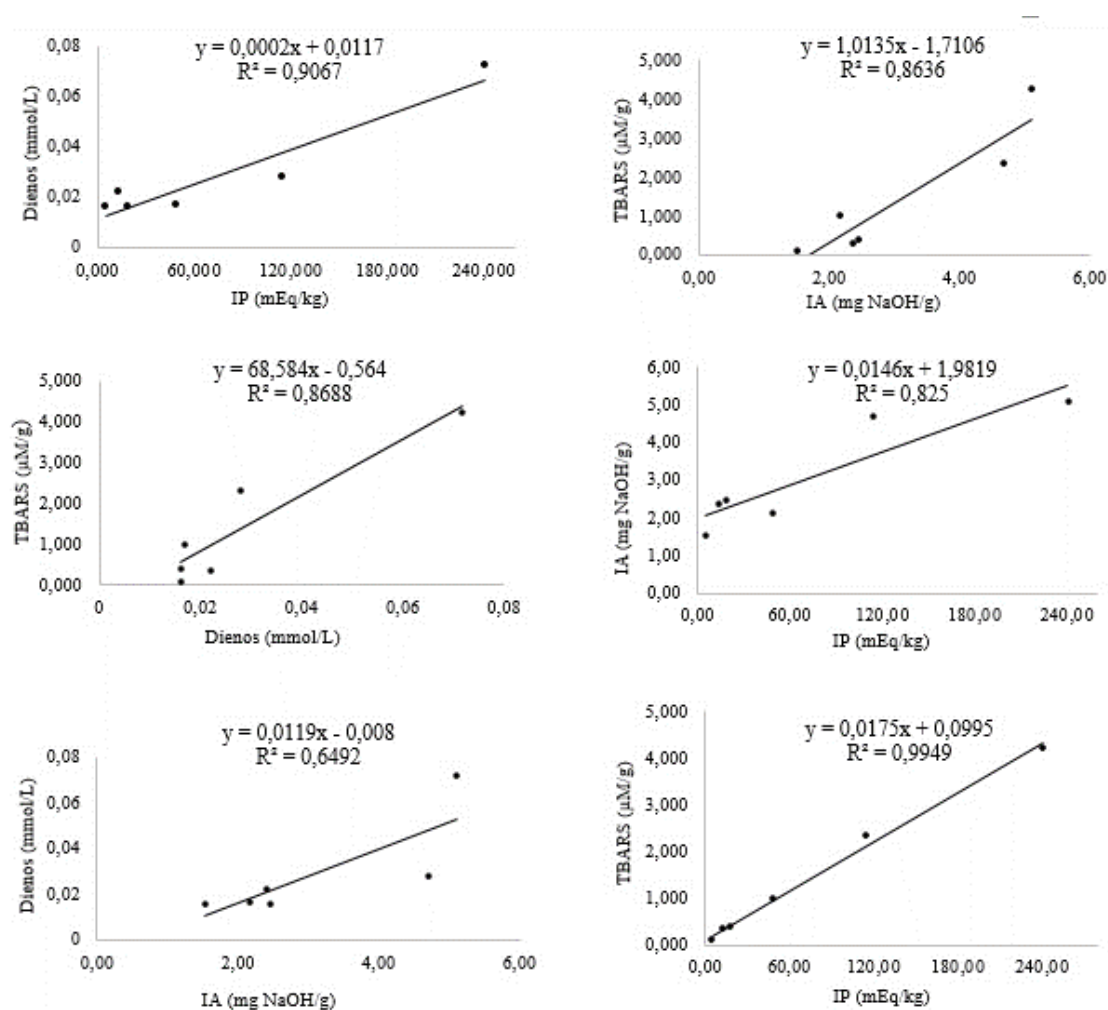


Figura 11. Possíveis correlações entre as análises de IA, IP, TBARS e Dienes.

Por meio de modelos matemáticos, foi possível gerar dados a respeito da qualidade da gordura de aves, obtendo valores para as variáveis em diferentes períodos em estufa que não foram analisados em laboratório (Tabela 4).

Tabela 4. Predição de valores gerados para Oxistest, IP, IA, TBARS e Dienos com base nos modelos matemáticos da Figura 2.

Tempo em estufa (horas)	Oxistest (P.I¹-min.)	IP (mEq/kg)	IA (mg NaOH/g)	TBARS (μM/g)	Dienos (mmol/L)
10	138,610	6,539	1,861	0,145	0,020
20	130,539	7,605	1,859	0,167	0,018
30	122,937	8,844	1,869	0,193	0,016
40	115,779	10,285	1,891	0,223	0,014
50	109,037	11,962	1,925	0,258	0,013
60	102,688	13,911	1,971	0,298	0,012
70	96,708	16,178	2,029	0,344	0,012
80	91,077	18,815	2,099	0,397	0,012
90	85,774	21,881	2,181	0,459	0,012
100	80,779	25,448	2,275	0,530	0,013
110	76,075	29,595	2,381	0,612	0,014
120	71,646	34,418	2,499	0,706	0,016
130	67,474	40,028	2,629	0,816	0,018
140	63,545	46,551	2,771	0,942	0,020
150	59,845	54,138	2,925	1,088	0,023
160	56,360	62,962	3,091	1,256	0,026
170	53,078	73,223	3,269	1,451	0,030
180	49,987	85,157	3,459	1,676	0,034
190	47,077	99,036	3,661	1,935	0,038
200	44,335	115,176	3,875	2,235	0,043
210	41,754	133,947	4,101	2,581	0,048
220	39,322	155,778	4,339	2,981	0,054
230	37,033	181,166	4,589	3,443	0,060
240	34,876	210,693	4,851	3,976	0,066
250	32,845	245,031	5,125	4,591	0,073

¹: Período de indução

É possível observar que após 40 horas em estufa, a amostra controle apresenta um valor de IP igual a 10,285 mEq/kg de peróxido e TBARS igual a 0,223 μ M/g, valores considerados limítrofes para a qualidade de uma gordura a ser utilizada em alimentação animal (ABINPET, 2015).

Ainda utilizando modelos matemáticos, foi possível estabelecer a relação entre o IP da amostra controle armazenada em estufa, e em temperatura ambiente. Na tabela 5, pode-se observar a quantidade de dias à temperatura ambiente e horas a 60°C necessárias para que a amostra deste experimento atinja índices de peróxido, predeterminados.

Tabela 5. Dados comparativos do IP da gordura controle armazenada em estufa, e em temperatura ambiente.

IP (mEq.kg ⁻¹)	Temp. Ambiente (dias)	Tempo em estufa (horas)
10	28	38
20	60	84
40	93	130
60	112	157
80	125	176
100	136	191
120	144	203
140	151	213
160	158	222
180	163	230
200	168	237
220	172	243
240	177	249

Equação para predição do índice de peróxido em estufa: $y = 5,6225e^{0,0151x}$

Equação para predição do índice de peróxido a temperatura ambiente: $y = 5,4893e^{0,0214x}$

A figura 12 apresenta o gráfico de correlação entre as medidas obtidas para prever quando a amostra de gordura de aves atingiria determinado índice de peróxido, sendo submetida à temperatura ambiente, ou em estufa a 60°C. Com os dados obtidos, é possível dizer a quantidade de horas em estufa equivalentes em dias à temperatura ambiente.

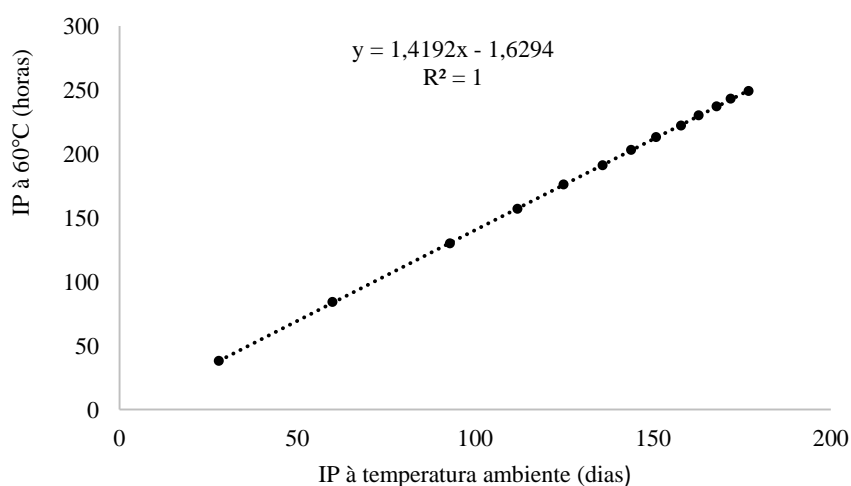


Figura 12. Gráfico de correlação do Índice de Peróxido predito à temperatura ambiente, em dias, e em estufa de ventilação forçada a 60°C, em horas.

3.2. Análise de dados referentes à gordura de aves tratada com Antiox AV e BHT

Os resultados obtidos com as análises laboratoriais de Oxitest, IP, IA, TBARS e Dienos, das amostras tratadas com antioxidantes sintéticos, BHA + BHT e BHT, podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados dos experimentos gerados pelo programa estatístico Design Expert 10, para as análises laboratoriais de Oxitest, IP, IA, TBARS e Dienos.

Dosagem (mg/kg)	Tempo (horas)	Oxitest (minutos)	IP (mEq/kg)	IA (mg NaOH/g)	TBARS (μM/g)	Dienos (mmol/L)
BHA+BHT						
225,00	144,00	417	16,65	2,54	0,067	0,015
101,26	211,88	113	47,69	2,87	1,141	0,015
225,00	144,00	404	16,92	2,06	0,069	0,015
225,00	48,00	537	6,61	1,38	0,15	0,019
348,74	211,88	601	19,46	4,88	0,361	0,016
101,26	76,12	254	12,21	2,21	0,306	0,016
25,00	144,00	452	17,19	2,3	0,069	0,015
50,00	144,00	114	35,77	2,29	0,76	0,016
225,00	240,00	308	43,25	3,13	0,465	0,029
225,00	144,00	419	16,92	3,68	0,068	0,015
348,74	76,12	701	7,45	2,59	0,131	0,015
400,00	144,00	698	12,88	1,98	0,257	0,012
BHT						
225,00	144,00	733	10,13	2,14	0,243	0,015
101,26	211,88	351	24,69	3,63	0,516	0,016
400,00	144,00	1040	7,95	1,72	0,131	0,014
225,00	240,00	621	22,66	4,1	0,386	0,013
225,00	144,00	712	10,25	2,35	0,201	0,015
225,00	144,00	724	10,71	2,02	0,185	0,014
225,00	48,00	809	5,16	1,41	0,125	0,017
348,74	211,88	930	12,54	2,89	0,214	0,012
101,26	76,12	467	7,86	2,36	0,174	0,014
348,74	76,12	1079	4,92	1,74	0,052	0,014
50,00	144,00	227	20,37	2,01	0,46	0,013
225,00	144,00	737	10,36	2,17	0,21	0,015

A partir dos resultados expostos, o programa estatístico Design Expert gerou Análises de Variância para cada uma das análises, tanto para as amostras tratadas com BHA+BHT, como para as amostras tratadas somente com BHT (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7. Análises de Variância (ANOVA) e modelos ajustados para cada Oxitest, IA, IP, TBARS e Dienos Conjugados, para gordura de aves tratada com cinco níveis crescentes de BHA+BHT.

Fontes	Soma dos Quadrados	GL ^a	Desvios Quadráticos Médios	F-Value	P-value prob > F
Oxitest					
Modelo	4,28*10 ⁵	5	85662,34	142,06	< 0.0001
Nível ^b	3,88*10 ⁵	1	3,88*10 ⁵	642,79	< 0.0001
Tempo ^c	39882,63	1	39882,63	66,14	0,0002
Nível*Tempo	420,25	1	420,25	0,70	0,4358
Nível ²	384,40	1	384,40	0,64	0,4551
Tempo ²	1,60	1	1,60	2,65*10 ⁻³	0,9606
Resíduo	3617,95	6	602,99	-	-
Falta de Ajuste	2363,95	3	787,98	1,89	0,3078
Erro Puro	1254,00	3	418,00	-	-
Cor Total	4,32*10 ⁵	11	-	-	-
Índice de Peróxido					
Modelo	2008,82	5	401,76	122,71	< 0.0001
Nível	534,01	1	534,01	163,10	< 0.0001
Tempo	1232,73	1	1232,73	376,50	< 0.0001
Nível*Tempo	137,71	1	137,71	42,06	0,0006
Nível ²	56,50	1	56,50	17,26	0,0060
Tempo ²	68,59	1	68,59	20,95	0,0038
Resíduo	19,65	6	3,27	-	-
Falta de Ajuste	19,50	3	6,50	133,74	0,0011
Erro Puro	0,15	3	0,049	-	-
Cor Total	2028,46	11	-	-	-
Índice de Acidez					
Modelo	4,15	2	2,08	3,72	0,0665
Nível	0,48	1	0,48	0,85	0,3800
Tempo	3,68	1	3,68	6,58	0,0304
Resíduo	5,03	9	0,56	-	-
Falta de Ajuste	3,48	6	0,58	1,13	0,5000
Erro Puro	1,54	3	0,51	-	-
Cor Total	9,18	11	-	-	-
TBARS					
Modelo	1,15	5	0,23	20,46	0,0010
Nível	0,35	1	0,35	31,00	0,0014
Tempo	0,29	1	0,29	25,47	0,0023
Nível*Tempo	0,092	1	0,092	8,17	0,0288
Nível ²	0,37	1	0,37	32,74	0,0012
Tempo ²	0,12	1	0,12	11,01	0,0160
Resíduo	0,067	6	0,011	-	-
Falta de Ajuste	0,067	3	0,022	24428,32	< 0.0001
Erro Puro	2,75*10 ⁻⁶	3	9,17*10 ⁻⁷	-	-
Cor Total	1,21	11	-	-	-

Dienos					
Modelo	$1,44 \cdot 10^{-4}$	5	$2,87 \cdot 10^{-5}$	3,22	0,0936
Nível	$4,00 \cdot 10^{-6}$	1	$4,00 \cdot 10^{-6}$	0,45	0,5279
Tempo	$2,50 \cdot 10^{-5}$	1	$2,50 \cdot 10^{-5}$	2,80	0,1451
Nível*Tempo	$1,00 \cdot 10^{-6}$	1	$1,00 \cdot 10^{-6}$	0,11	0,7491
Nível ²	$1,21 \cdot 10^{-5}$	1	$1,21 \cdot 10^{-5}$	1,36	0,2883
Tempo ²	$8,41 \cdot 10^{-5}$	1	$8,41 \cdot 10^{-5}$	9,43	0,0219
Resíduo	$5,35 \cdot 10^{-5}$	6	$8,92 \cdot 10^{-6}$	-	-
Falta de Ajuste	$5,35 \cdot 10^{-5}$	3	$1,78 \cdot 10^{-5}$	-	-
Erro Puro	0	3	0	-	-
Cor Total	$1,97 \cdot 10^{-4}$	11	-	-	-

^a Grau de liberdade

^b Antiox AV (ppm)

^c Tempo (horas)

Para Oxitest, o valor de F de 142,06 indica que o modelo é significativo. Valores de Prob > F menores que 0,05 indicam que o modelo é significativo, portanto Nível e Tempo podem ser consideradas variáveis significativas. Os valores de R^2 , R^2 ajustado e coeficiente de variação (CV) de 0,9916, 0,9846 e 5,87, respectivamente também indicam que o modelo obtido é satisfatório, linear e preciso.

Para as análises de Peróxido, o valor de F do modelo (122,71), indica sua significância. Neste modelo, Nível, Tempo, Nível*Tempo, Nível² e Tempo² são variáveis significantes. Os valores de R^2 , R^2 ajustado e CV (0,9903, 0,9822 e 8,58, respectivamente), mostram que o modelo obtido é satisfatório, linear e preciso.

A análise de variância para Acidez apresentou um valor de F igual a 3,72, indicando que o modelo é significativo. Neste caso, a variável Tempo é significativa. R^2 , R^2 ajustado e CV de 0,4524, 0,3308 e 28,11, respectivamente. Apesar do modelo ter se ajustado, os baixos valores de R^2 e R^2 ajustado, e o alto CV, não trazem precisão e linearidade ao modelo.

No caso de TBARS, o valor de F obtido foi de 20,46, indicando que o modelo é significativo. As variáveis Nível, Tempo, Nível*Tempo, Nível² e Tempo² são significativas para o modelo. O valor de “Lack of fit F-value” de 24428,32 implica que a falta de ajuste do modelo é significativa, o que não é bom, pois o desejado é que o modelo se ajuste. Os valores de R^2 , R^2 ajustado e CV (0,9446, 0,8984 e 33,03) demonstram possíveis problemas no modelo ou nos dados.

Por fim, ANOVA de Dienos indicou um valor de F de 3,22, ou seja, o modelo e a variável Tempo² são significativos. R^2 , R^2 ajustado e CV obtidos foram de 0,7284, 0,5021 e 18,10 indicando que o modelo pode ser utilizado, mas com ressalvas.

Todos os ajustes levaram às equações 3, 4, 5, 6 e 7 em termos de fatores atuais (Nível = BHA+BHT em ppm, Tempo= tempo em horas).

$$\text{Oxitest} = 188,71791 + 1,83082*\text{Nível} - 1,34594*\text{Tempo} + 0,0012202*\text{Nível}*\text{Tempo} - 5,06122*10^{-4}*\text{Nível}^2 + 1,08507*10^{-4}*\text{Tempo}^2 \quad (3)$$

$$\text{Peróxido} = 7,36633 - 0,052758*\text{Nível} + 0,13542*\text{Tempo} - 6,98512*10^{-4}*\text{Nível}*\text{Tempo} + 1,94041*10^{-4}*\text{Nível}^2 + 7,10449*10^{-4}*\text{Tempo}^2 \quad (4)$$

$$\text{Acidez} = 0,77711 + 1,97141*10^{-3}*\text{Nível} + 9,98949*10^{-3}*\text{Tempo} \quad (5)$$

$$\text{TBARS} = 0,87892 - 6,12327*10^{-3}*\text{Nível} - 1,84301*10^{-3}*\text{Tempo} - 1,80060*10^{-5}*\text{Nível}*\text{Tempo} + 1,56286*10^{-5}*\text{Nível}^2 + 3,01242*10^{-5}*\text{Tempo}^2 \quad (6)$$

$$\text{Dienos} = 0,026231 + 2,61224*10^{-5}*\text{Nível} - 2,13914*10^{-4}*\text{Tempo} + 5,95238*10^{-8}*\text{Nível}*\text{Tempo} - 8,97959*10^{-8}*\text{Nível}^2 + 7,86675*10^{-7}*\text{Tempo}^2 \quad (7)$$

Tabela 8. Análises de Variância (ANOVA) e modelos ajustados para cada Oxitest, IA, IP, TBARS e Dienos Conjugados, para gordura de frangos tratada com cinco níveis crescentes de BHT.

Fontes	Soma dos Quadrados	GL ^a	Desvios Quadráticos Médios	F-Value	P-value prob > F
Oxitest					
Modelo	7,31*10 ⁵	5	1,46*10 ⁵	325,36	< 0.0001
Nível ^b	6,85*10 ⁵	1	6,85*10 ⁵	1525,24	< 0.0001
Tempo ^c	35228,15	1	35228,15	78,45	0,0001
Nível*Tempo	272,25	1	272,25	0,61	0,4658
Nível ²	9424,90	1	9424,90	20,99	0,0038
Tempo ²	36,10	1	36,10	8,00*10 ⁻²	0,7863
Resíduo	2694,23	6	449,04	-	-
Falta de Ajuste	2325,23	3	775,08	6,30	0,0824
Erro puro	369,00	3	123,00	-	-
Cor Total	7,33*10 ⁵	11	-	-	-
Peróxido					
Modelo	479,65	5	95,93	101,67	< 0.0001
Nível	133,29	1	133,29	141,27	< 0.0001
Tempo	302,56	1	302,56	320,67	< 0.0001
Nível*Tempo	21,21	1	21,21	22,48	0,0032
Nível ²	14,70	1	14,70	15,58	0,0076
Tempo ²	12,38	1	12,38	13,12	0,0111

Resíduo	5,66	6	0,94	-	-
Falta de Ajuste	5,47	3	1,82	29,20	0,0101
Erro Puro	0,19	3	0,062	-	-
Cor Total	485,31	11	-	-	-
Acidez					
Modelo	6,29	5	1,26	11,68	0,0048
Nível	0,39	1	0,39	3,64	0,1051
Tempo	4,84	1	4,84	44,97	0,0005
Nível*Tempo	$3,60 \cdot 10^{-3}$	1	$3,60 \cdot 10^{-3}$	0,033	0,8609
Nível ²	0,028	1	0,028	0,26	0,6278
Tempo ²	0,92	1	0,92	8,53	0,0266
Resíduo	0,65	6	0,11	-	-
Falta de Ajuste	0,59	3	0,20	10,58	0,0419
Erro Puro	0,056	3	0,019	-	-
Cor Total	6,94	11	-	-	-
TBARS					
Modelo	0,190	2	0,097	38,55	< 0.0001
Nível	0,099	1	0,099	39,26	0,0001
Tempo	0,095	1	0,095	37,84	0,0002
Resíduo	0,023	9	$2,52 \cdot 10^{-3}$	-	-
Falta de Ajuste	0,021	6	$3,48 \cdot 10^{-3}$	5,81	0,0885
Erro Puro	$1,80 \cdot 10^{-3}$	3	$5,98 \cdot 10^{-4}$	-	-
Cor Total	0,220	11	-	-	-
Dienos					
Modelo	$8,84 \cdot 10^{-6}$	3	$2,95 \cdot 10^{-6}$	1,99	0,1939
Nível	$8,36 \cdot 10^{-7}$	1	$8,36 \cdot 10^{-7}$	0,57	0,4737
Tempo	$4,00 \cdot 10^{-6}$	1	$4,00 \cdot 10^{-6}$	2,70	0,1387
Nível*Tempo	$4,00 \cdot 10^{-6}$	1	$4,00 \cdot 10^{-6}$	2,70	0,1387
Resíduo	$1,18 \cdot 10^{-5}$	8	$1,48 \cdot 10^{-6}$	-	-
Falta de Ajuste	$1,11 \cdot 10^{-5}$	5	$2,22 \cdot 10^{-6}$	8,86	0,0511
Erro Puro	$7,50 \cdot 10^{-7}$	3	$2,50 \cdot 10^{-7}$	-	-
Cor Total	2,07E-05	11	-	-	-

^a Grau de liberdade

^b Antiox AV (ppm)

^c Tempo (horas)

A análise de variância dos dados de Oxitest mostrou um modelo significativo, com valor de f de 325,36. As variáveis Nível, Tempo e Nível² são significativas. Para R², R² ajustado e CV, os valores obtidos foram de 0,9963, 0,9933 e 3,02 respectivamente, indicando que o modelo adotado é satisfatório, linear e preciso.

Para Peróxido, o valor de f igual a 101,67 implica que o modelo é significativo. Neste caso, Nível, Tempo, Nível*Tempo, Nível², Tempo² são variáveis significativas. A

falta de ajuste de 29,20 indica significância, ou seja, o modelo não ajustou. Os valores de R^2 , R^2 ajustado e CV foram de 0,9883, 0,9786 e 7,90, respectivamente.

Em relação a Acidez, o valor de F obtido foi de 11,68, indicando que o modelo é significativo, bem como as variáveis Tempo e Tempo². Foram obtidos os valores de 0,9068, 0,8292 e 13,80 para R^2 , R^2 ajustado e CV, respectivamente, demonstrando que o modelo apresenta graus de precisão e linearidade razoavelmente satisfatórios.

Em se tratando de TBARS, o valor de f igual a 38,55 mostra que o modelo escolhido é significativo, e Nível e Tempo são variáveis significativas. R^2 , R^2 ajustado e CV apresentaram valores de 0,8955, 0,8722 e 20,79. O modelo apresenta certo grau de precisão, mas pode apresentar erros consideráveis.

A ANOVA dos dados de Dienos indicou valor de 1,99, ou seja, o modelo escolhido não é significativo, bem como nenhuma das variáveis em questão. Os valores de R^2 , R^2 ajustado e CV são de 0,4275, 0,2129 e 8,48, respectivamente.

Todos os ajustes levaram às equações 8, 9, 10, 11 e 12 em termos de fatores atuais (A= BHT em ppm, B= tempo em horas).

$$\text{Oxitest} = 187,24530 + 3,63370 \cdot \text{Nível} - 0,90502 \cdot \text{Tempo} - 9,82143 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Nível} \cdot \text{Tempo} - 2,50612 \cdot 10^{-3} \cdot \text{Nível}^2 + 5,15408 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Tempo}^2 \quad (8)$$

$$\text{Peróxido} = 7,12616 - 0,038055 \cdot \text{Nível} + 0,065356 \cdot \text{Tempo} - 2,74107 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Nível} \cdot \text{Tempo} + 9,89796 \cdot 10^{-5} \cdot \text{Nível}^2 + 3,01785 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Tempo}^2 \quad (9)$$

$$\text{Acidez} = 2,29150 + 6,73131 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Nível} - 0,011407 \cdot \text{Tempo} - 3,57143 \cdot 10^{-6} \cdot \text{Nível} \cdot \text{Tempo} - 4,32653 \cdot 10^{-6} \cdot \text{Nível}^2 + 8,21940 \cdot 10^{-5} \cdot \text{Tempo}^2 \quad (10)$$

$$\text{TBARS} = 0,21202 - 8,98305 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Nível} + 1,60777 \cdot 10^{-3} \cdot \text{Tempo} \quad (11)$$

$$\text{Dienos} = 0,012564 + 1,45308 \cdot 10^{-5} \cdot \text{Nível} + 1,63690 \cdot 10^{-5} \cdot \text{Tempo} - 1,19048 \cdot 10^{-7} \cdot \text{Nível} \cdot \text{Tempo} \quad (12)$$

Com os gráficos de superfície gerados pelo Design Expert 7, foi possível verificar que há a necessidade de se adicionar 200 mg/kg de BHT na gordura de frango para se ter no máximo 10 mEq/kg de IP ao final de 100 dias de estocagem à temperatura

ambiente e sendo que para BHA+BHT, estes valores foram de aproximadamente 390 mg/kg (Figura 13 e 14).

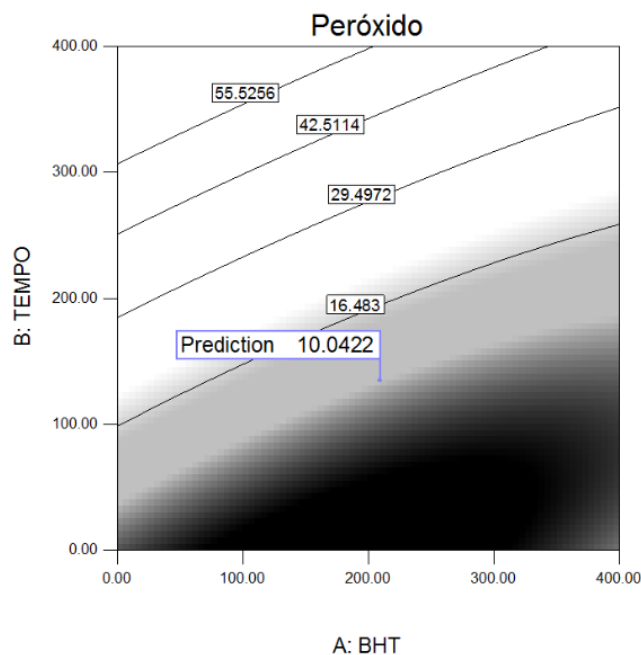


Figura 13. Gráfico de superfície com estimativa de valor de peróxido em gordura de frango estabilizada com 200 mg/kg de BHT e estocada por aproximadamente 100 dias.

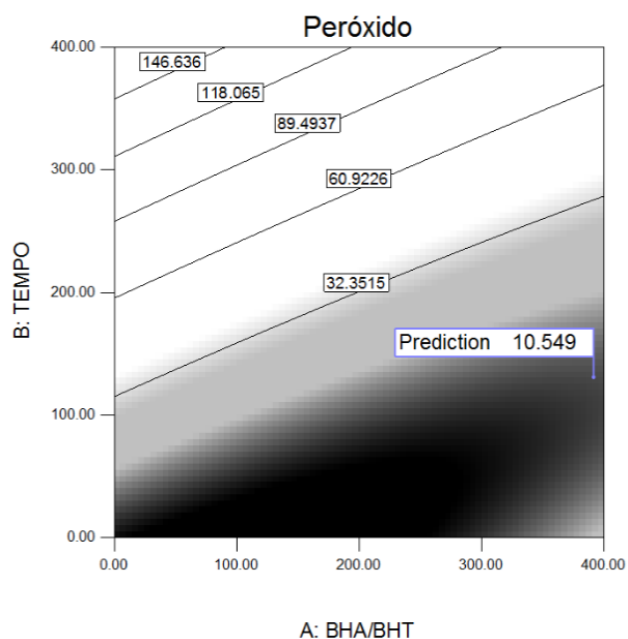


Figura 14. Gráfico de superfície com estimativa de valor de peróxido em gordura de frango estabilizada com 390 mg/kg de BHA/BHT e estocada por aproximadamente 100 dias.

Com relação às amostras tratadas com BHA+BHT e BHT, nos gráficos de superfície (figura 15 e 16) para IA, IP e TBARS, é possível definir a correlação positiva entre grau de oxidação e tempo, e a correlação negativa entre o nível de antioxidante e o

grau de oxidação. Ou seja, quanto maior o tempo em estufa, e menor a quantidade do antioxidante adicionada à amostra, maior o grau de oxidação lipídica.

O método do Oxitest se mostrou eficaz em mensurar a capacidade antioxidante de um composto, além de prever o tempo de prateleira das amostras. Há correlação positiva entre período de indução e nível de antioxidante, e correlação negativa entre período de indução e tempo em estufa. O método se assemelha ao Rancimat, que também utiliza altas temperaturas para se estimar o “end point” (Halliwell et al., 1995).

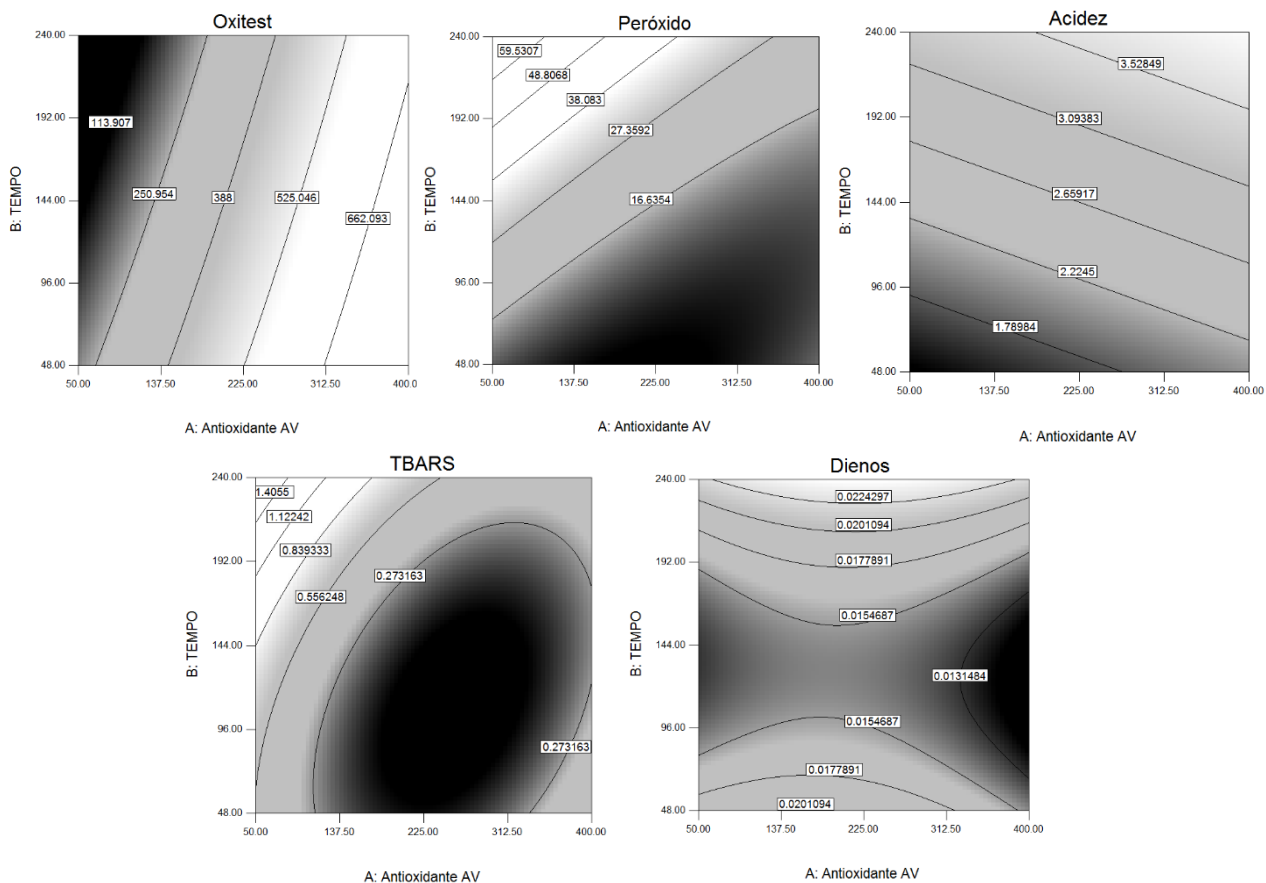


Figura 15. Gráficos de superfície-resposta de Oxitest (minutos), IP (mEq/kg), IA (mg NaOH /g), TBARS ($\mu\text{M/g}$) e Dienos Conjugados (mmol/L). O eixo vertical representa o tempo em estufa (horas), e o eixo horizontal os níveis de BHA+BHT (Antioxidante AV) adicionado à gordura de aves (ppm).

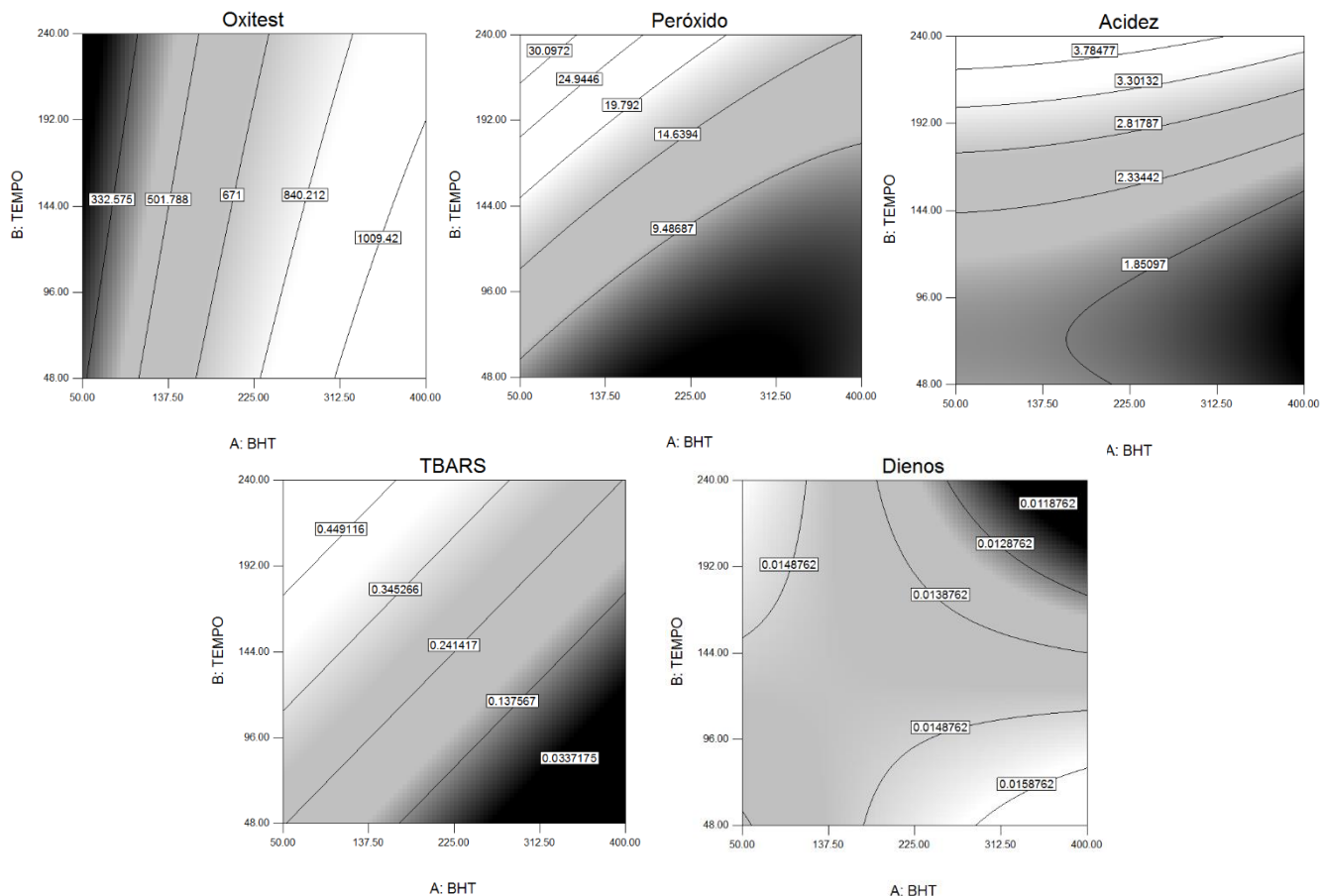


Figura 16. Gráficos de superfície-resposta de Oxitest (minutos), IP (mEq/kg), IA (mg NaOH/g), TBARS ($\mu\text{M/g}$) e Dienos Conjugados (mmol/L). O eixo vertical representa o tempo em estufa (horas), e o eixo horizontal os níveis de BHT adicionado à gordura de aves (ppm).

3.3. Quantificação de ácidos graxos na gordura por CG

Na tabela 9, é possível observar, que todos os ácidos graxos sofreram degeneração conforme a gordura permanecia por mais horas em estufa, com exceção do Ácido Láurico. Os ácidos graxos em maiores quantidades na gordura de aves foram o Ácido Oleico e Linoleico, com valores aproximados de 19.436 mg/100g e 15.966 mg/100g, respectivamente. A concentração de todos os demais diminuiu com a oxidação. Nota-se que após 240 horas, a média ficou em 36 % de perda para todos os ácidos graxos encontrados na gordura de frango. Não foi diferente a redução nas concentrações de ácidos graxos saturados ou poli-insaturados.

Tabela 9. Ácidos graxos presentes na gordura de aves, e suas respectivas concentrações nos diferentes momentos em que foram retirados da estufa.

Nome	Concentrações (mg/100g)		
	48 horas	144 horas	240 horas
Láurico	11,68 ± 1,21	11,89 ± 0,11	7,57 ± 0,55
Mirístico	239,52 ± 23,04	191,81 ± 14,65	158,03 ± 10,92
	49,90 ± 5,71	38,07 ± 3,46	32,06 ± 1,78
Pentadecílico	45,90 ± 4,60	35,54 ± 3,36	29,97 ± 1,87
Palmítico	11066,22 ± 972,59	8468,24 ± 745,17	7165,80 ± 452,87
	181,05 ± 15,62	139,50 ± 11,79	118,78 ± 8,05
Pamitoleico	1631,35 ± 144,68	1233,80 ± 108,24	1061,15 ± 72,21
Margárico	87,52 ± 7,44	65,91 ± 5,92	55,19 ± 3,95
	102,90 ± 9,44	80,13 ± 8,03	65,41 ± 4,08
Esteárico	3626,81 ± 317,34	2773,69 ± 246,64	2324,86 ± 141,46
Oleico	19346,01 ± 1787,00	14656,52 ± 1320,26	12313,24 ± 768,49
Vacênico	792,69 ± 63,49	641,36 ± 54,38	556,89 ± 36,39
Linoleico	15966,53 ± 1407,08	11773,49 ± 1021,30	9844,58 ± 628,39
Gama-linolênico	112,13 ± 10,54	81,98 ± 7,32	67,57 ± 4,93
Alfa-linolênico	1173,87 ± 104,27	856,03 ± 77,35	701,77 ± 45,70
Araquídico	71,59 ± 6,18	53,89 ± 5,34	42,52 ± 3,00
Gondoico	167,46 ± 13,78	127,83 ± 11,63	104,04 ± 6,40
	93,96 ± 7,87	69,70 ± 5,19	57,33 ± 3,61
Di-homo-gama-linolênico	68,68 ± 5,64	50,53 ± 4,61	39,97 ± 2,92
Araquidônico	122,86 ± 8,01	122,35 ± 1,60	74,19 ± 7,51
Behênico	18,35 ± 1,40	18,07 ± 1,62	12,82 ± 1,52
Cis-5,8,11,14,17- Eicosapentaenoico	15,95 ± 1,43	15,27 ± 0,97	9,61 ± 1,08
Adrênico	36,60 ± 3,30	34,71 ± 2,44	18,30 ± 1,95
	5,45 ± 0,55	6,20 ± 0,25	4,14 ± 0,37
Lignocérico	9,29 ± 0,84	9,20 ± 0,77	5,79 ± 0,29
Nervônico	23,24 ± 1,99	21,38 ± 2,18	12,70 ± 0,95
Cis-4,7,10,13,16,19- Docosahexaenoico	13,82 ± 1,97	9,58 ± 1,88	10,80 ± 0,80
AGS^a	15270,83 ± 1023,40	11697,94 ± 785,13	9859,88 ± 474,62
AGMI^b	22294,57 ± 1794,13	16938,58 ± 1325,94	14264,27 ± 772,82
AGPI^c	17515,90 ± 1411,02	12950,15 ± 1024,27	10770,93 ± 630,12
n-6^d	16312,25 ± 1407,16	12069,26 ± 1021,34	10048,75 ± 628,46
n-3^e	1203,65 ± 104,30	880,88 ± 77,38	722,18 ± 45,72

^a Ácidos graxos saturados

^b Ácidos graxos monoinsaturados

^c Ácidos graxos poli-insaturados

^d Ácidos graxos ômega-6

^e Ácidos graxos ômega 3

3.4. Quantificação das perdas de BHT

É possível afirmar que houve degradação de BHT na gordura de frango, com o passar do tempo, em estufa (Tabela 10). No entanto, nas amostras analisadas, o tempo de retenção se alterou, e o pico do antioxidante foi encontrado ao redor dos 17 minutos, como pode ser observado nas amostras A, C, D e E. As amostras B e F foram as que mais se aproximaram do padrão, e os picos foram evidenciados em torno dos 35 minutos. É preciso observar, contudo, que as amostras A, D e F apresentaram mais BHT na concentração final do que na inicial.

Tabela 10. Quantificação de BHT em amostra de gordura de aves, por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).

Amostra	CI ^a	Tempo em estufa ^b	CF ^c
BHA+BHT			
A	101,26	76	224,83
A	101,26	212	199,13
B	225,00	144	105,62
B	225,00	240	83,41
C	348,74	76	241,57
C	348,74	212	221,00
BHT			
D	101,26	76	335,79
D	101,26	212	166,24
E	225,00	144	192,66
E	225,00	240	145,84
F	348,74	76	571,64
F	348,74	212	374,94

^a Concentração de antioxidante adicionada à amostra de gordura de frangos, em ppm.

^b Tempo de permanência da amostra em estufa a 60°C, em minutos.

^c Concentração final de BHT na amostra, em ppm.

3.5. Palatabilidade

Os animais consumiram em média $45,04 \pm 3,45$ g de alimento por dia. O consumo foi considerado adequado, embora tenha sido aproximadamente 80 % do valor estimado de manutenção dos animais. Inicialmente no estudo, ao testar a sensibilidade dos gatos para os testes de preferência, os resultados de aptidão foram satisfatórios e podem ser verificados na Tabela 11.

Tabela 11. Razão de Ingestão (RI) nos testes de preferência alimentar para a verificação da capacidade dos gatos de discriminação entre dois alimentos.

Desafio	RI-A	RI-B	P
Controle vs. Controle	0,53	0,47	Ns
Controle vs. Alimento AP ²	0,02	0,98	0,0001

¹ RI. Razão de Ingestão de A ou de B. A é sempre o alimento da esquerda e B o da direita da coluna desafio.

² Alimento AP. Um alimento com alto teor de gordura e elevada palatabilidade já verificada em testes anteriores.

Os resultados de RI obtidos nos seis desafios entre os alimentos com diferentes teores de peróxidos, realizados em gaiolas individuais ou em gatil coletivo, não diferiram entre si, conforme pode ser visto na Tabela 12.

Tabela 12. Comparação entre a Razão de Ingestão (RI) para a dieta B nos desafios em gaiolas individuais ou em gatil coletivo.

Desafios	Dieta A	Dieta B	Razão de ingestão para Dieta B	
			Coletivo	Individual
1	Controle	T-10	0,60	0,49
2	Controle	T-20	0,54	0,45
3	Controle	T-40	0,46	0,50
4	Controle	T-80	0,56	0,56
5	T-10	T-40	0,40	0,52
6	T-20	T-80	0,55	0,58
Média			0,52	0,52
Desvio Padrão			0,06	0,06

Ao invés de se comparar as médias de percepção olfativa entre os alimentos Controle e com diferentes teores de peróxido, verificou-se os efeitos quadráticos de regressão para a percepção olfativa de acordo com o aumento nas concentrações de peróxido. Pode-se verificar que, os gatos tiveram a percepção do peróxido nos alimentos e inclusive maior atração olfativa pelos mesmos até o nível de peróxido na gordura de 40mEq/kg. Porém, no maior nível houve aparente repulsão pelos animais (Figura 17).

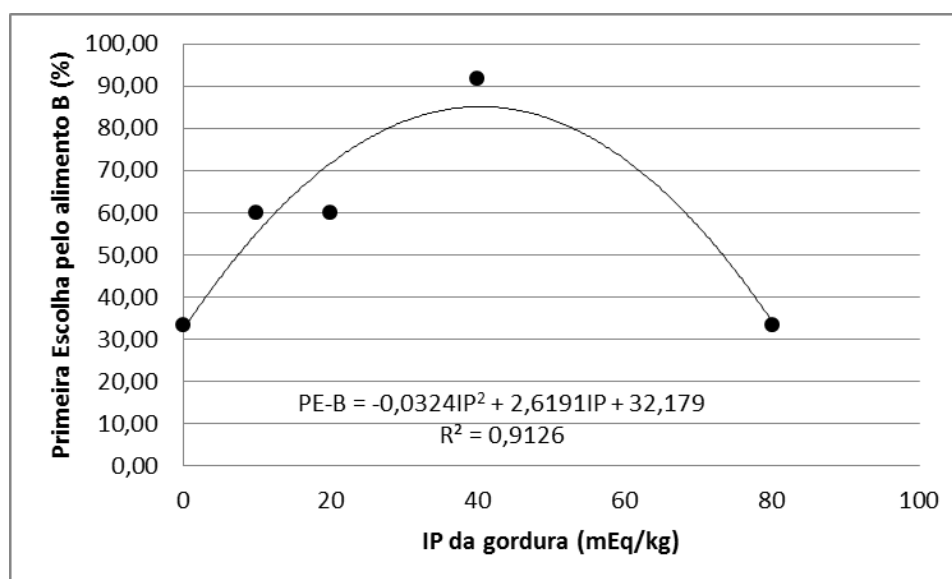


Figura 17. Percepção olfativa pelo alimento B em função do índice de peróxido da gordura de aves.

3.6. NIRS

A capacidade preditiva de NIRS para todos os parâmetros analisados foram altas, com destaque para IP e TBARS, com R^2 de 0,9988 e 0,9954, respectivamente (Tabela 13).

Tabela 13. Curva de calibração para a estimativa de IA, IP, TBARS e Dienos em amostras de gordura de aves pelo NIRS.

Ítem	IA	IP	TBARS	Dienos
Dados de calibração das curvas				
N ¹	62	62	61	41
Média ²	2.4576	31.0945	0.5955	0.0154
Mínimo e Máximo	0 - 4.8271	0 - 136.3285	0 - 2.5641	0,0050 - 0.0232
R ^{2*}	0.9624	0.9988	0.9954	0.9722
SECV ³	0.3593	9.3468	0.1015	0.0025
1-VR ⁴	0.8014	0.9309	0.9767	0.1792

*: coeficiente de determinação

¹: número de amostras usadas pelo software após exclusão de outliers

²: valores de valores de IA em mg de NaOH/g, IP em mEq/kg, TBARS em μ M/g, Dienos em mmol/L

³: erro de validação cruzada

⁴: Coeficiente de regressão corrigido pelo erro de validação cruzada.

A figura 18 representa o espectro de NIRS das médias para a gordura de aves sem adição de antioxidantes. É possível observar diferentes faixas de absorção entre 400 e 2500 nm, que da forma como estão dispostos, de acordo com a literatura, caracterizam o espectro da maioria dos óleos (Cozzolino et al., 2005; Rao et al., 2009). Os picos mais

proeminentes, foram encontrados ao redor de 1400 nm, 1700 nm e entre 2300 e 2400 nm. Nestas faixas, encontram-se compostos C-H, C-H do primeiro *overtone* e C-H do segundo *overtone*, respectivamente (Kumar et al., 2011).

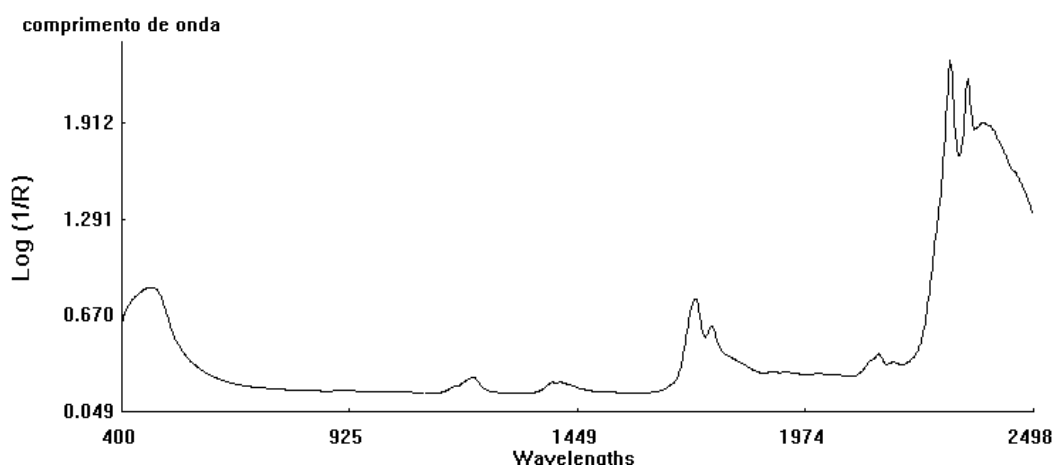


Figura 14. Espectro da amostra controle de gordura de aves, gerada pelo NIRS.

Na tabela 14, encontram-se os comprimentos de onda selecionados para a elaboração das curvas preditivas de todos os parâmetros previamente estabelecidos. Para TBARS e Dienos é possível observar faixas de absorção de 584 nm e 456 nm, e 488nm, respectivamente, que não fazem parte do espectro do infravermelho próximo.

Tabela 14. Comprimentos de onda utilizados pelo NIRS para a elaboração das curvas de calibração de IA, IP, TBARS e Dienos.

	IA	IP	TBARS	Dienos
C.O.1	1056	2092	1796	488
C.O.2	2084	880	584	1852
C.O.3	704	1212	1940	1484
C.O.4	1064	2084	2068	1540
C.O.5	2012	2076	456	-
C.O.6	-	2068	2076	-

C.O. = Comprimento de onda (nm)

4. Discussão

Os resultados obtidos com a gordura controle estabelecem um padrão de oxidação da gordura utilizada neste trabalho quando nenhum tipo de antioxidante é adicionado, e a mesma é submetida às condições de temperatura constante em 60°C. As análises de IP e TBARS mostraram resultados consistentes com o esperado, de que

quanto maior o tempo sob aquecimento, maior a taxa de oxidação, ou consequente, formação de peróxidos e aldeídos, respectivamente (Medina-Meza et al., 2014). Os dados encontrados a partir destes parâmetros mostraram linearidade, demonstrando que são métodos confiáveis e precisos para serem utilizados na avaliação do grau de oxidação lipídica de uma determinada amostra, e consequentemente, a qualidade do material em questão.

Apesar das críticas existentes à determinação de IP, por este ser um método subjetivo, uma vez que a titulação é feita de forma visual (Silva et al., 1999), neste estudo, os resultados foram satisfatórios, provavelmente, pelas análises serem realizadas pelo mesmo operador e nas mesmas condições. Já a técnica utilizada para a análise de TBARS, elimina a subjetividade, por se tratar do processo de quantificação em espectrofotômetro, eliminando a etapa visual (Barriuso et al., 2013). Apesar de pouco utilizada pela indústria atualmente, provavelmente, pela falta de determinação de valores de normalidade, o TBARS é um método de fácil execução e custo relativamente baixo, sendo exequível na prática.

Os limites de tolerância no Controle de Qualidade Industrial para óleos e gorduras empregados em petfood para IP são de 10 mEq/kg (ABINPET, 2015). Na tentativa de se estabelecer a correspondência para os limites de tolerância para TBARS para gordura de aves, pode-se verificar na Tabela 3, que quando o nível de peróxido estava em 10,28 mEq/kg, as concentrações de TBARS estavam em 0,22 mM.

É interessante ressaltar a alta correlação ($R^2 = 0,9949$) entre IP e TBARS, o que demonstra claramente, que com o desenvolvimento da oxidação, conforme vão se formando peróxidos, estes vão sofrendo quebras e se transformam em aldeídos (Barriuso et al., 2013; Medina-Meza et al., 2014). Da mesma forma, Dienes e IP apresentaram relativamente alta correlação ($R^2 = 0,9067$), ambos os métodos quantificam os produtos iniciais da oxidação lipídica. Em um estudo com óleo de canola submetido ao aquecimento de 63°C durante 6 dias, os autores também encontraram uma alta correlação entre Índice de Peróxido e Dienes Conjugados (Vieira e Regitano-d'Arce, 2001).

No entanto, dienos não é tão utilizado como IP, apesar de ser um método simples e rápido, os valores do grau de oxidação podem ser tanto subestimados, porque a técnica não permite a detecção de hidroperóxidos com menos de duas duplas ligações ou superestimados, caso existam duplas ligações conjugadas na gordura original (Barriuso et al., 2013). Além do mais a presença de carotenoides na amostra pode afetar

a análise, estes são absorvidos na mesma região do espectro que os dienos conjugados, a 232nm (Shahidi e Zhong, 2005).

Com relação a IA, método indicado para se quantificar ácidos graxos livres em uma amostra, os dados sofreram aumento ao longo do tempo, porém, este método apresentou baixas correlações com os demais. Isso se dá possivelmente, devido ao método ser baseado unicamente na titulação por NaOH, e depender principalmente da subjetividade do analista e leituras de pH. Além disso, por ser uma reação complexa, quantificar a quantidade exata de ácidos graxos livres, e de H^+ , não é tão simples (Pacheco e Regitano-D'arce, 2009).

Apesar disto, a análise é altamente recomendada para a indústria com o intuito de se saber se determinada amostra está em processo adiantado de decomposição. No entanto, pela simplicidade do método, é necessário atentar as possíveis fraudes, que podem “mascarar” o grau de acidez do produto.

Através de modelos matemáticos, foram geradas fórmulas para a determinação de valores de Oxitest, IA, IP, TBARS e Dienos em períodos em que não houve coleta de amostra para análise. Os melhores ajustes, mais confiáveis e precisos se deram para IP, TBARS e Oxitest, sendo que todos estes parâmetros se ajustaram melhor para equação exponencial, e a capacidade preditiva destes parâmetros ficaram acima de 0,90. Isto indica a confiabilidade destes métodos para análises.

As demais análises apresentam confiabilidade, mas menor, e menos precisa, e não se ajustaram ao modelo exponencial, mas sim ao quadrático, não significando que não sejam recomendadas a serem usadas ou preteridas. Estas equações geradas para se estimar o período de indução pelo Oxitest, o IP e TBARS, possibilitam definir as doses dos antioxidantes testados para se ter pelo menos três meses de *shelf-life* da gordura de frango, sem que estes índices extrapolem os valores de normalidade.

As perdas de AG durante o processo de oxidação lipídica comprovam a deterioração do valor nutricional das fontes lipídicas pela oxidação e reforçam a importância da estabilização da gordura com antioxidantes, sejam eles naturais ou sintéticos. Esses resultados corroboram com os obtidos por Morelló et al. (2004), que também constataram perdas de ácidos graxos em óleo de oliva armazenado durante 12 meses. No entanto, ao contrário do presente estudo, os autores observaram leves aumentos de ácido linoleico ao longo do período de estocagem.

As recomendações de ácidos graxos essenciais para gatos são para linoleico, araquidônico, linolênico, eicosapentaenoico e docosahexaenóico, sendo estes três

últimos apenas para filhotes (NRC, 2006). Alimentos com baixos teores de lipídeos e oxidados parcialmente podem não atender as recomendações.

Quando na formulação de um alimento completo para animais de companhia, são levados em consideração os valores de AG presentes nos ingredientes que serão adicionados (Case, 2011; NRC, 2006). Se um determinado ingrediente sofreu oxidação lipídica, conforme as análises de CGS mostraram neste trabalho, houve perda de AGs, conseqüentemente, o produto final não apresentará a quantidade de AGs que o formulador estabeleceu de início, e isso prejudicará a nutrição dos animais. Neste estudo, não houve diferenças significativas entre perdas de AG saturados e AG insaturados.

As análises de HPLC mostraram que, dentro de uma mesma concentração do antioxidante, houve redução nas concentrações em função do tempo em estufa, o que era o esperado. No entanto, três das amostras analisadas (A, D e F) apresentaram concentrações maiores do que as adicionadas originalmente, após horas em estufa. Este fato, apesar de inesperado, pode ocorrer pelas transformações que o antioxidante sofre quando submetido ao aquecimento. Lin et al. (1981), observaram alterações estruturais em antioxidantes (BHA e TBHQ) submetidos à altas temperaturas de 180°C. Portanto é possível que, o pico encontrado não se referia necessariamente ao antioxidante, mas talvez a substância gerada a partir do mesmo, com estrutura química similar. Contudo, análises mais aprofundadas são altamente recomendadas para se averiguar esta hipótese.

O teste de palatabilidade teve por principal objetivo observar se os gatos conseguem perceber diferença de IP em alimentos oferecidos. Tendo como base, que gatos são animais bastante seletivos, e que se recusam a ingerir um alimento que não os agrada (Zaghini & Biagi, 2005; Green et al., 2008), foram realizados dois experimentos semelhantes, mas em locais diferentes. Conforme observado, não houve diferença na ingestão de alimentos para gatos em gaiola e gatil coletivo. Este é um dado importante pois preconiza o bem-estar dos animais e retira-se o efeito “gaiola”.

Por outro lado, para a determinação da primeira escolha, o teste precisa ser feito em gaiola, pois pode haver interferência do local em que a vasilha foi colocada, ou a presença de outros gatos se alimentando de determinado alimentos. Na gaiola, também não há alterações de comportamento coletivo dos animais, sendo possível avaliar padrões individuais de consumo.

Devido ao fato da ração utilizada no experimento já apresentar 1,24 mE/kg de peróxido, e a quantidade de gordura de frango adicionada ter sido de 5% em diferentes

graus de oxidação, os valores finais estimados de peróxido da ração para Controle, T-10, T-20, T-40 e T-80 foram de 1,38 mEq/kg, 1,82 mEq/kg, 2,18 mEq/kg, 3,51 mEq/kg e 5,15 mEq/kg, respectivamente. Pode-se verificar desta forma que os valores de peróxido foram baixos no alimento, embora conforme a recomendação da ABINPET (2015), o último tratamento tenha apresentado valores superiores aos tolerados. Com relação ao consumo, os gatos pareceram ser indiferentes aos alimentos com baixos IP, dentro dos limites aceitáveis para o controle de qualidade da indústria. É possível que valores mais elevados tenham efeito deletério sobre o consumo e RI.

Neste estudo foram utilizados 20 gatos adultos. Com este número de animais, assumir que uma RI para A ou B de 0,60 é significativa, pode induzir o pesquisador a erros na tomada de decisão, podendo este erro ser de 33 %. Para que este erro reduza a níveis aceitáveis (inferior a 5 %) é necessário assumir como significativa apenas uma RI de no mínimo 0,70 para A ou B (Griffin, 2003). Apesar de ter sido realizada a comparação de média nos desafios realizados entre A e B, os dados também foram analisados seguindo as recomendações de Griffin (2003), uma vez que esta é mais conservadora, evitando tomadas erradas de decisão sobre a preferência alimentar dos gatos.

Desta forma, apesar do desafio entre o alimento Controle vs. 80 mEq/kg de peróxido ter sido significativo em gatil coletivo, optou-se por sumarizar todos os resultados como não significativos (Tabela 15). Em síntese, pelos resultados obtidos foi possível inferir que os gatos foram sensíveis em detectar a presença de oxidação na gordura dos alimentos, porém, os baixos níveis de peróxido (< 6 mEq/kg) nas rações não afetou negativamente a preferência alimentar dos animais.

Gross e colaboradores (1994), em estudo com cães, submeteram alimentos completos à estocagem sob altas temperaturas, e sob temperatura ambiente, utilizando diferentes antioxidantes. Os pesquisadores forneceram os diferentes tratamentos para cães adultos, e puderam observar que os cães tinham uma clara preferência por alimentos frescos em comparação com os armazenados. Também verificaram que a preferência por determinados alimentos, aumentava conforme o IP diminuía.

Tabela 15. Preferência alimentar entre o alimento Controle versus com diferentes teores de peróxido (10, 20, 40 e 80 mEq/kg). Testes realizados em gatil coletivo ou em gaiolas individuais.

Tipo de Teste	IP	Razão de Ingestão		P	Percepção Olfativa	
		A	B		A	B
Individual	10	0,51	0,49	0,47	40,00	60,00
	20	0,55	0,45	0,18	40,00	60,00
	40	0,50	0,50	0,47	8,33	91,67
	80	0,44	0,56	0,15	66,67	33,33
Coletivo	10	0,40	0,60	0,09	-	-
	20	0,46	0,54	0,19	-	-
	40	0,54	0,46	0,21	-	-
	80	0,44	0,56	0,0001	-	-

A. Alimento A

B. Alimento B

P. Resultados estatísticos

As curvas de calibração para os parâmetros oxidativos pelo NIRS apresentaram ajustes satisfatórios. Apesar disto, deve-se ter cautela em recomendar esta técnica para o uso de rotina na indústria, uma vez que neste estudo, a matriz na qual estes índices foram determinados foi exatamente a mesma amostra de gordura de frango. Considerando que os parâmetros oxidativos são da ordem de miliequivalentes, milimolar ou miligramas por quilograma de alimento, caso os picos de reflectância pelo NIRS sejam similares aqueles que representam os AGs, expressos na ordem de gramas por quilograma, ao se modificar uma certa amostra, que apresente teores de AGs diferentes da utilizada e se, ainda, o pico de reflectância destes AGs coincidir com aqueles dos parâmetros oxidativos, pode-se obter erros significativos na estimativa dos parâmetros oxidativos.

Conforme verificado para a gordura de frango sem antioxidante, a mesma apresentou os principais picos nos comprimentos de onda 1200, 1400, 1700 e 2300-2400 nm. Por outro lado, IP, TBARS e IA apresentaram picos selecionados para a elaboração das curvas, desde comprimentos de onda inferiores a 1000 nm até valores ao redor de 2000 nm, os quais não coincidem com aqueles da gordura antes de sofrer oxidação. Estes achados viabilizam o uso do NIRS em situações práticas pela indústria para determinar a qualidade da mesma. No entanto, é necessário validar estes dados em estudos futuros.

Os comprimentos de onda selecionados pelo NIRS para que fossem formadas as curvas para IA, IP, TBARS e Dienos, trazem algumas informações relevantes. Para IA e IP, as faixas selecionadas correspondem principalmente a ligações OH e NH. Na curva

de TBARS, prevaleceram comprimentos de onda que correspondem principalmente a ligações OH, e em uma delas (1940nm), corresponde à água. Para Dienos, diferentemente dos demais, uma das faixas escolhidas, corresponde a ligação C-C1, no comprimento de onda 1852nm, e outro que foi definido como amido (1540nm) (Kumar et al., 2011).

Shenk e Westerhaus (1996) consideram os valores de coeficiente de determinação (R^2) e erro de validação cruzada (SECV), respectivamente, acima de 0,90 e menor que 1,5xSEL (erro padrão laboratorial), uma equação de capacidade preditiva excelente; R^2 entre 0,70 e 0,90 e SECV entre 2-3xSEL, com boa capacidade preditiva; R^2 abaixo de 0,70, apenas com capacidade discriminante entre baixos, médios e altos valores; R^2 abaixo de 0,50, apenas com capacidade discriminante entre altos e baixos valores.

Considerando os valores de R^2 encontrados para TBARS e IP, de 0,9988 e 0,9954, respectivamente, as curvas para estes parâmetros apresentaram boa capacidade preditiva para as condições impostas para a gordura utilizada neste estudo, apresentando uso potencial na prática. No entanto, validações com diferentes tipos de óleos e gorduras, de diversas proveniências são importantes para se garantir com securidade de que as curvas fornecerão resultados precisos.

5. Conclusão

Como conclusões neste estudo foi possível verificar que:

- O TBARS e IP são os métodos convencionais que apresentam resultados mais coerentes entre si. Como não existem valores de referência para TBARS, neste estudo foi possível verificar que 0,22 mM de equivalente de MDA são valores limítrofes para a qualidade da gordura de frango, embora um estudo de validação seja necessário. O Oxitest mostrou ser um método eficaz nos estudos com antioxidantes, porém, não foi possível relacionar o período de indução por esta técnica com a vida de prateleira de acordo com o protocolo usado neste estudo;
- Para a gordura de aves não estabilizada com antioxidante, cada hora em estufa corresponde a aproximadamente 0,74 dias de estocagem a temperatura ambiente.

- O NIRS mostrou ser uma ferramenta passível de uso na estimativa dos parâmetros oxidativos em gordura de aves, principalmente IP e TBARS;
- As doses de BHT e BHA+BHT para estabilizar a gordura de aves por pelo menos 100 dias são respectivamente de 200 mg/kg e 390 mg/kg;
- Gatos são sensíveis em detectar a presença de peróxidos nos alimentos, porém, em baixas concentrações de IP (< 6 mEq/kg), não houve influência do IP sobre o consumo de alimentos nos gatos;
- Durante o processo de oxidação da gordura de aves, ocorre perda significativa do valor nutricional, visto pela redução em aproximadamente 40 % nas concentrações de ácidos graxos saturados e poli-insaturados.

6. Referências

Associação brasileira de indústria de produtos para animais de estimação, 2015. Manual pet food Brasil, eighth ed. Abinpet, Brasil.

Alam, M.N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, M., 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal, 21, 143-152.

Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., 2002. Methods for testing antioxidant activity. Analyst, 127, 183-198.

Association of Official Analytical Chemists, 2003. Official methods of analysis of AOAC international, seventeenth ed. Association of official analytical chemists, Arlington.

American Oil Chemists Society, 1990. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society, fourth ed. American Oil Chemists Society, Champaign.

Barriuso, B., Astiasarán, I., Ansorena, D., 2013. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. Eur. Food Res. Technol., 236, 1-15.

Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and Chemical Toxicology, 51, 15-25.

Case, L.P., 2011. Canine and feline nutrition: a resource for companion animal professionals. Evaluation of pet foods, third ed. Mosby Elsevier, Maryland Heights.

Choe, E., Min, D.B., 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. Comprehensive reviews in food Science and food safety, 5, 169-186.

Claus, T., Maruyama, S.A., Palmobini, S.V., Montanher, P.F., Bonafé, E.G., Santos Junior, O.O., Matsushita, M., Visentainer, J.V., 2015. Chemical characterization and use of artichoke parts for protection from oxidative stress in canola oil. *Food Science and Technology*, 61, 346-351.

Cozzolino, D., Murray, I., Chree, A., Scaife, J.R., 2005. Multivariate determination of free fatty acids and moisture in fish oils by partial least-squares regression and near-infrared spectroscopy. *LWT*, 821-828.

Dobarganes, M.C., Velasco, J., 2002. Analysis of lipids hydroperoxides. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 104, 420-428.

Figueiredo, I.L., Claus, T., Santos, O.O.J., Almeida, V.C., Magon, T., Visentainer, J.V., 2016. Fast derivatization of fatty acids in different meat samples for gas chromatography analysis. *Journal of Chromatography*, 1456, 235-241.

Gray, J.I., 1978. Measurement of lipid oxidation: a review. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 55, 539-546.

Green, A.S., Ramsey, J.J., Villaverde, C., Asami, D.K., Wei, A., Fascetti, A.J., 2008. Cats are able to adapt protein oxidation to protein intake provided their requirement for dietary protein is met. *The Journal of Nutrition*.

Griffin, R.W., 2005. *Petfood Technology - Palatability testing: Parameters and analyses that influence test conclusions*, first ed. Watt Publishing, Illinois.

Gross, K.L., Bollinger, R., Thawngmung, P., Collings, G.F., 1994. Effect of three different preservative systems on the stability of extruded dog food subjected to ambient and high temperature storage. *The Journal of Nutrition*, 2638- 2642.

Gülçin, I., 2012. Antioxidant activity of food constituents: a review. *Arch. Toxicol.*, 86, 345-391.

Halliwel, B., Aeschbach, R., Löliger, J., Aruoma, O.I., 1995. The characterization of antioxidants. *Fd Chem. Toxic.*, 33, 601-617.

Instituto Adolfo Lutz, 1985. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*, third ed. IMESP, São Paulo.

Ke, P., Woyewoda, A., 1979. Microdetermination of thiobarbituric acid values in marine lipids by a direct spectrophotometric method with a monophasic reaction system. *Analytica Chimica Acta*, 106, 279-284.

Kumar, D.S, Aenugu, H.P.R., Parthiban, N., Ghosh, S.S., Banji, D., 2011. Near infrared spectroscopy – an overview. *Int. J. ChemTech Res*, 3, 825-836.

Lin, F.S., Warner, C.R., Fazio, T., 1981. Alteration of phenolic antioxidants in heated vegetable oil. *Journal of American Oil Chemists Society*, July, 789-792.

- Medina-Meza, I.G., Barnaba, C., Barbosa-Cánovas, G.V., 2014. Effects of high pressure processing on lipid oxidation: a review. *Innovative food Science and emerging Technologies*, 22, 1-10.
- Morelló, J.R., Motilva, M.J., Tovar, M.J., Romero, M.P., 2004. Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85, 357-364.
- Morris, J.G., 2004. Do cats need arachidonic acid in the diet for reproduction? *J. Ani. Phys. and Ani. Nutr.*, 88, 131-137.
- National Research Council, 2006. *Nutrient Requirements of dogs and cats*. Rev.ed. National Academy of Sciences, Washington.
- Osawa, C.C., Gonçalves, L.A.G., Ragazzi, S., 2008. Evaluation of the quality of pet foods using fast techniques and official methods. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 28, 223-230.
- Pacheco, S.G.A., Regitano-D'arce, M.A.B., 2009. Estabilidade oxidativa de óleo de peixe encapsulado em diferentes tipos de embalagem em condição ambiente. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 29.
- Pet Brasil, 2016. Mercado Brasileiro.
<http://www.petbrasil.org.br/mercado-brasileiro> (accessed in 03.30.16)
- Pokorný, J., 2007. Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidants? *Eur. J. Sci. Technol.*, 109, 629-642.
- Rao, Y., Xiang, B., Zhou, X., Wang, Z., Xie, S., Xu, J., 2009. Quantitative and qualitative determination of acid value of peanut oil using near-infrared spectrometry. *Journal of Food Engineering*, 93, 249-252.
- Semb, T.N., Rustad, T., Mozuraityte, R., Kristinova, V., 2012. *Analytical Methods for Determination of the Oxidative Status in Oils*. Institute of Biotechnology: Institutt for bioteknologi, Master thesis.
<http://brage.bibsys.no/xmlui/handle/11250/245799?show=full> (access in 04.10.16)
- Silva, F.A.M., Borges, M.F.M., Ferreira, M.A., 1999. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Quim. Nova*, 22, 94-103.
- Shahidi, F., Zhong, Y., 2005. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products – Lipid Oxidation: measurement methods*, sixth ed. John Wiley & Sons, Inc., Newfoundland.
- Shahidi, F., 2015. *Handbook of antioxidants for food preservation*, Elsevier, Sawston.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., 1996. *Near Infrared Spectroscopy: the future waves NIR* Publications. Chichester, 198-202.
- Tian, F., Decker, E.A., Goddard, J.M., 2013. Controlling lipid oxidation of food by active packaging Technologies. *Food. Funct.*, 4, 669-680.

Vieira, T.M.F.S., Reginato-d'arce, M.A.B., 2001. Canola oil thermal oxidation during oven test and microwave heating. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 34, 215-221.

Yildiz, G., Wehling, R.L., Cuppett, S.L., 2003. Comparison of four analytical methods for the determination of peroxid value in oxidized soybean oils. *JAOCS*, 80, 103-107.

Zaghini, G., Biagi, G., 2005. Nutritional peculiarities and diet palatability in the cat. *Veterinary Research Communications*, 29, 39-44.