

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

Francielly Oliveira Santos

**AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE POR MÉTODO ACELERADO EM
ALIMENTO ESPECÍFICO SEMIÚMIDO PARA CÃES COM INCLUSÃO DE
ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS E NATURAL**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

Francielly Oliveira Santos

AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE POR MÉTODO ACELERADO EM
ALIMENTO ESPECÍFICO SEMIÚMIDO PARA CÃES COM INCLUSÃO DE
ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS E NATURAL

Defesa apresentada à Faculdade de Engenharia - UNESP, Câmpus Ilha Solteira como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Laurentiz
Coorientador Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

Ilha Solteira
2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

- S237a Santos, Francielly Oliveira.
- Avaliação de estabilidade por método acelerado em alimento específico semiúmido para cães com inclusão de antioxidantes sintéticos e natural / Francielly Oliveira Santos. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2023
68 f.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2023
- Orientador: Antonio Carlos de Laurentiz
Co-orientador: Ricardo Souza Vasconcellos
Inclui bibliografia
1. Antioxidante. 2. Comida para animais de estimação. 3. Rancidez oxidativa.
4. Tempo de prateleira.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação da estabilidade por método acelerado em alimento específico semiúmido para cães com inclusão de antioxidantes sintéticos e natural

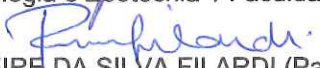
AUTORA: FRANCIELLY OLIVEIRA SANTOS

ORIENTADOR: ANTONIO CARLOS DE LAURENTIZ

COORIENTADOR: RICARDO SOUZA VASCONCELLOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência e Tecnologia Animal, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:


Prof.Dr. ANTONIO CARLOS DE LAURENTIZ (Participação Virtual)
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia - UNESP - Câmpus de Ilha Solteira


Profa. Dra. ROSEMEIRE DA SILVA FILARDI (Participação Virtual)
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia - UNESP - Câmpus de Ilha Solteira

Profa. Dra. CRISTIANE SOARES DA SILVA ARAÚJO (Participação Virtual)
Nutrição e Produção Animal / Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP



Ilha Solteira, 14 de abril de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

No ano de 2012 ingressou no curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Católica de Goiás – PUC GO, em Goiânia, através do Programa de Universidade para Todos (PROUNI). Obteve o grau de Engenharia de Alimentos no ano de 2017. Em 2019 ingressou no MBA em Engenharia de Produção e Gestão da Qualidade no Instituto de Pós-Graduação e Graduação – IPOG, em Goiânia, sendo outorgada com o título de especialista. Em fevereiro de 2021, iniciou o curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus pelo dom da vida, por me dar força, sabedoria e a oportunidade de todos os dias buscar meu crescimento espiritual.

A minha mãe, meus irmãos, meus avós, minha sogra, meu sogro e meus cunhados por todo apoio, orações e principalmente pelo amor, carinho e compreensão.

Agradeço em especial ao meu companheiro Edson Junior, por estar ao meu lado em todos os momentos, sempre me apoiando e me dando forças para conquistar meus objetivos. Pela paciência, amor e cumplicidade, por me apoiar até quando nem eu mesma acreditava, sem você não conseguiria chegar até aqui, e essa foi mais uma conquista nossa, a você minha eterna gratidão.

Ao meu orientador, prof. Dr. Antonio Carlos de Laurentiz por todo o apoio e parceria, por me mostrar o quanto é rico os laços que se firmam entre o acadêmico e o profissional (Universidade – Empresa), e a todos os professores que contribuíram com seus ensinamentos para meu crescimento profissional e por terem dedicado o seu tempo em momentos em que houve dúvidas e curiosidades.

Ao coorientador prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos, por todo o conhecimento compartilhado, pelo suporte e comprometimento ao longo do trabalho desenvolvido.

Ao funcionário Sidival Antunes de Carvalho, técnico do laboratório de bromatologia do departamento de Biologia e Zootecnia da UNESP de Ilha Solteira pelo auxílio, dedicação e carinho. A graduanda Gabriela Anciolotto do curso de zootecnia pelo comprometimento diante do trabalho proposto.

A parceria da empresa Kemin, por proporcionar subsídios nas análises e matérias primas, por todo apoio e suporte no desenvolvimento deste trabalho, não poderia deixar de citar a Maina Silva sem ela essa parceria não seria tão prazerosa e eficiente.

Ao todo corpo da Kelco Industrial, primeiramente pela oportunidade de ser parte do time, por proporcionar base e estrutura para realização deste projeto. A minha Gerente Milena Perina, que me capacita para ser uma profissional melhor dia após dia, me oferecendo todo o suporte possível e necessário, ao Gerente Jean Gasperini que me apresentou ao programa de pós-graduação e ao meu Orientador, e acreditou no meu potencial. A Nayla Barcello por seu meu braço na empresa, estando comigo desde o primeiro dia de trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos que a vida me presenteou nesta etapa da minha vida, Ana Paula Dourado, Rafael Mandarin, Silvana de Carvalho e Ildebrando Selestino, obrigada pela amizade, pelo ombro e ouvido amigo, por levarem a alegria em dias que a saudade, mas apertava por estar longe de casa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A persistência é o caminho do êxito.
Charles Chaplin

RESUMO

O mercado Pet brasileiro movimentou em 2022 41,96 bilhões de reais no ano de 2022, sendo 80% representado pela linha de Pet Food, responsável pela alimentação de 149,6 milhões de animais de estimação, dos quais, 58,1 milhões (38,9%) representam cães. Na linha de alimentos para cães são fabricados alimentos semiúmidos, cuja composição apresenta teor de umidade entre 20 a 35% e elevados teores de proteína e lipídios. Para aumentar a estabilidade oxidativa e estender o tempo de prateleira (*shelf life*) a fabricação dos alimentos semiúmidos requer a utilização de antioxidantes. No presente estudo foi avaliado o efeito da utilização de diferentes níveis de antioxidantes sintéticos e natural, sobre tempo de prateleira, utilizando método de aceleração como simulador das condições. O estudo foi realizado em parceria com a Kelco Industrial, empresa de produção de alimentos para o seguimento da nutrição de cães e gatos, analisando as mudanças das características físico-químicas, bromatológicas e microbiológicas em amostras com diferentes dosagens de antioxidante (BHA com BHT e Tocoferol), distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em um esquema fatorial (2X3+1), sendo uma fonte de antioxidante sintético e outra de antioxidante natural com três níveis de inclusão, e mais um tratamento controle sem antioxidante, totalizando 7 tratamentos, as amostras laboratoriais foram consideradas as repetições do tempo de processo de fabricação das amostras, sendo três repetições por tratamento. As análises foram realizadas mensalmente no período de seis meses. As amostras que receberam as dosagens de antioxidantes apresentaram os melhores resultados e performance em comparação a amostra controle, principalmente em relação a estabilidade oxidativa através dos resultados dos ativos para os antioxidantes, sendo o antioxidante sintético o que apresentou melhor performance, comprovando o efeito dos antioxidantes que têm como o objetivo principal retardar a reação de oxidação.

Palavras-chave: antioxidante; comida para animais de estimação; rancidez oxidativa; tempo de prateleira.

ABSTRAT

The Brazilian Pet market had a turnover of 41.96 billion reais in 2022, with 80% represented by the Pet Food line, responsible for feeding 149.6 million pets, of which 58.1 million (38.9%) represent dogs. The dog food line manufactures semi-moist foods, whose composition has a moisture content between 20 and 35% and high levels of protein and lipids. To increase oxidative stability and extend shelf life, the manufacture of semi-moist foods requires the use of antioxidants. In the present study, the effect of using different levels of synthetic and natural antioxidants on shelf life was evaluated, using the acceleration method as a simulator of the conditions. The study was carried out in partnership with Kelco Industrial, a food production company for monitoring the nutrition of dogs and cats, analyzing changes in physicochemical, bromatological and microbiological characteristics in samples with different antioxidant dosages (BHA with BHT and Tocopherol), distributed in a completely randomized design (DIC) in a factorial scheme (2X3+1), with a source of synthetic antioxidant and another of natural antioxidant with three levels of inclusion, plus a control treatment without antioxidant, totaling 7 treatments, the laboratory samples were considered the repetitions of the sample manufacturing process time, with three repetitions per treatment. Analyzes were performed monthly over a period of six months. The samples that received the antioxidant dosages showed the best results and performance compared to the control sample, mainly in relation to oxidative stability through the results of the actives for the antioxidants, being the synthetic antioxidant the one that presented the best performance, proving the effect of the antioxidants whose main objective is to delay the oxidation reaction.

Keywords: antioxidant; pet food; oxidative rancidity; shelf life.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus
IN	Instrução Normativa
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
UR	Umidade Relativa
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
TBHQ	Terc-butilhidroquinona
TAVP	Testes Acelerados de Shelf life
ABINPET	Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação
AW	Atividade de Água
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
pH	Potencial Hidrogeniônico
V	Volts
mV	Milivolts
OH	Radical Hidroxil
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Eh	Potencial de Oxirredução
UV	Ultravioleta
IV	Infravermelho
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
PPM	Partes por milhão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
2.3	Hipóteses	14
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1	Shelf Life	15
3.2	Antioxidantes.....	16
3.2.1	Antioxidante Sintético	18
3.2.2	Antioxidante Natural	19
3.3	Métodos de determinação de <i>shelf life</i>	21
3.3.1	Teste sob condição ambiente	23
3.3.2	Teste sob condição acelerada.....	23
3.4	Alimento Semiúmido extrusado	28
3.5	Fatores que interferem na determinação do <i>shelf-life</i>.....	29
3.5.1	Desenvolvimento de microrganismos	30
3.5.2	Reações químicas enzimáticas	31
3.5.3	Reações químicas não enzimáticas	32
3.5.3.1	<i>Escurecimento não enzimático</i>	<i>32</i>
3.5.3.2	<i>Oxidação de lipídeos</i>	<i>32</i>
3.5.3.3	<i>Perda e ganho de umidade</i>	<i>36</i>
3.6	Fatores extrínsecos: Condições de armazenamento	37
3.6.1	Temperatura.....	37
3.6.2	Embalagem	38
3.6.3	Luminosidade	39
3.7	Fatores intrínsecos que interferem na <i>shelf life</i>.....	39
3.7.1	Atividade de água.....	39
3.7.2	Acidez Total.....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1	Análise Estatística.....	45
4.1.1	Delineamento do estudo:	45

4.1.2	Cálculos dos tamanhos amostrais	45
4.1.3	Tamanho amostral:.....	46
4.2	Análises Laboratoriais	47
4.2.1	Análises físico-químicas:	47
4.2.1.1	<i>Análises de Umidade:.....</i>	<i>47</i>
4.2.1.2	<i>Análises de Atividade de água:.....</i>	<i>48</i>
4.2.1.3	<i>Análises de Acidez:</i>	<i>48</i>
4.2.1.4	<i>Análises de Índice de Peróxido:.....</i>	<i>48</i>
4.2.2	Análises bromatológicas:.....	49
4.2.3	Análises microbiológicas:	49
4.2.4	Análises residual de antioxidantes:.....	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

No Brasil em 2022 o mercado *Pet* movimentou 41,96 bilhões de reais, desse total 80% representaram o mercado de *Pet Food*, destinado à alimentação de 149,6 milhões de animais de estimação, onde os cães representam 58,1 milhões, 38,9% do total de animais de estimação no país (Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação - ABINPET 2023). A indústria de produção de alimentos *pet food* busca sempre a produção de alimentos saudáveis e seguros para os animais, atendendo assim a saúde dos animais e consequentemente agradando o seu tutor.

Alimentos semiúmidos são aqueles que apresentam de 20 a 35% de umidade, podendo ser classificados como completos ou específicos, de acordo com os nutrientes presentes em sua composição. Alimentos com estas características, durante o seu tempo de estocagem sofrem o processo de rancidez oxidativa, que é iniciado pelo ataque do oxigênio molecular às duplas ligações dos ácidos graxos insaturados que compõe o lipídeo, situação que compromete seu tempo de prateleira (SILVA et al., 2017).

O *Shelf Life* é o período em que alimento permanece com qualidade aceitável pelo consumidor, seguro (microbiologicamente) e sem alterações sensoriais, químicas e físicas. Portanto o *shelf life* é determinado por um conjunto de propriedades dos alimentos como a formulação, processamento, embalagem e condições de armazenamento (FERRARI, 1998).

A dificuldade em definir o *shelf life* pode ser vista na própria definição do *Institute of Food Technologists (IFT)*, que define o prazo de validade como o “período entre a fabricação e compra no varejo de um produto alimentício, durante o qual o produto é de qualidade satisfatória”. O uso das palavras “qualidade satisfatória” é muito vago para servir de ajuda prática, especialmente nas situações em que a segurança microbiana não é um problema (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2015).

De acordo com Grizotto et al. (2006), o estudo de *shelf life* de produtos alimentícios consiste em submeter várias amostras a uma série de testes e examiná-las durante um período até o limite de aceitação. São observadas as alterações na qualidade do produto e o tempo que ele leva para se deteriorar até o limite que o torna impróprio para o consumo. A identificação dos atributos que se alteram e a definição quantitativa desse atributo são maneiras de monitorar a perda de qualidade durante o armazenamento.

Os alimentos são sistemas complexos e ativos. Assim, para avaliar a vida de prateleira de um alimento é necessário compreender o conjunto de reações microbiológicas, enzimáticas e físico-químicas que existem no seu interior, e identificar os motivos e mecanismos responsáveis pela sua degradação ou perda de características.

Como medida usual, a indústria *pet food* faz uso de antioxidantes, na busca por melhorar a estabilidade oxidativa e consequentemente estender o tempo de *shelf life* dos produtos. Os antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais, com a função de neutralizar os radicais livres e inibir ou retardar a oxidação (BUTOLO, 2010). Os antioxidantes sintéticos são os mais utilizados na indústria de alimentação animal, como o BHT (Butilhidroxitolueno), BHA (Butilhidroxianisol), TBHQ (Terc-butilhidroquinona), PG (Propilgalato) e o Etoxiqum, enquanto os naturais são extratos vegetais (MENDES, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se a inclusão de antioxidantes sintéticos (mistura comercial de BHA e BHT) ou natural (mistura comercial de extrato de chá verde, alecrim e tocoferóis) influenciam a estabilidade oxidativa de um alimento semiúmido específico para cães.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar se níveis dos antioxidantes sintéticos BHT e BHA e natural Tocoferol, promovem diferenças nas características físico-químicas, bromatológicas e microbiológicas, e na estabilidade de alimento semiúmido para cães durante seu armazenamento.

- Avaliar se os testes acelerados para simular o tempo de estocagem são eficientes para avaliar o tempo de prateleira.

- Fornece informações para a indústria de alimentos Pet Food que possam melhorar a shelf life de seus produtos.

2.3 Hipóteses

1- Os resultados serão mais satisfatórios para o BHT e BHA, sendo este o mais empregado na indústria de alimentos, possivelmente pelo custo e disponibilidade no mercado e também porque possuem estabilidade no processo e ao longo da vida de prateleira bem conhecidos.

2- Os testes acelerados produzem resultados confiáveis para avaliar a estabilidade oxidativa em alimentos semiúmidos, os quais apresentam boa associação com os resultados obtidos em condições ambientes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Shelf Life

O *shelf life* é o período em que alimento permanece com qualidade aceitável pelo consumidor, seguro (microbiologicamente) e sem alterações sensoriais, químicas e físicas. Determinada por um conjunto de propriedades dos alimentos como a formulação, processamento, embalagem e condições de armazenamento (FERRARI, 1998).

Este termo representa o tempo de vida útil de qualquer alimento. O tempo que mantido em condições adequadas de exposição ao ar e luminosidade, o produto se mantém próprio para o consumo, apresentando alterações que são consideradas aceitáveis pelo fabricante, consumidor e a legislação alimentar vigente (VITALI & QUAST, 2004).

Os tutores estão muito mais exigentes em relação à qualidade do alimento destinado ao seu animal. Por isso é tão importante o conhecimento do tempo de vida útil (*shelf life*) do produto e os fatores que podem afetar sua qualidade, fazendo com que esse tempo de vida útil seja diminuído. Estes fatores podem ser por exemplo, a umidade, acidez e índice de peróxido. Um fator importante para *shelf life* de alimentos é o teor de água, pois através deste é possível ter controle da taxa de deterioração do alimento (FELLOWS, 2006).

O tempo de validade de um produto leva em consideração a classificação do mesmo e o tipo de processamento ao qual foi submetido, a fim de identificar potenciais fontes físico-químicas, enzimáticas, sensoriais ou microbiológicas que podem acarretar a diminuição da vida útil do produto. O *shelf life* é ditado por fatores intrínsecos (matéria-prima, formulação do produto e estrutura) e extrínsecos (tratamento térmico, controle de temperatura, umidade relativa, exposição à luz UV e IV, contagem microbiana ambiental, composição da atmosfera dentro das embalagens, oxigênio e luz) (SILVA, 2018).

Segundo CALLIGARIS et al. (2008), um estudo de vida e tempo útil de qualquer produto alimentício pode ser dividido em três etapas fundamentais. A primeira etapa implica na identificação do alimento, sua composição química e física e nos possíveis eventos biológicos que podem fazer com que o alimento perca valor nutricional. A próxima etapa se caracteriza pela avaliação da mudança de qualidade do alimento

em função do tempo e armazenamento, nessa etapa se faz a aplicação de testes, sendo estes testes de prateleira em tempo real ou acelerado. E por fim, a última etapa se caracteriza pela coleta e modelagem dos dados para estimativa de vida útil.

Os alimentos são sistemas complexos e ativos. Assim, para avaliar a *shelf life* é preciso compreender o conjunto de reações microbiológicas, enzimáticas e físico-químicas que existem no seu interior e identificar os motivos e mecanismos responsáveis pela sua degradação ou perda de características (DIAS, 2007).

As rações para animais de companhia apresentam um tempo maior entre sua fabricação e validade. Normalmente essas rações exibem um *shelf life* de um ano, podendo se estender a 18 meses (BRASIL, 2009). Avaliação do *shelf life* apresenta suas dificuldades, principalmente para os produtos com um longo tempo de vida útil, como é o caso de alimentos secos e extrusados para cães e gatos. No entanto, esta é uma análise fundamental para indústria *pet food* manter sua reputação e marca no mercado (CALLIGARIS et al., 2015).

Como medida usual, a indústria *pet food* faz o uso de antioxidantes, na busca por melhorar a estabilidade oxidativa e consequentemente estender o tempo de *shelf life* dos produtos. Os antioxidantes podem ser aditivos sintéticos ou naturais, capazes de neutralizar os radicais livres e inibir ou retardar a oxidação (BUTOLO, 2010).

3.2 Antioxidantes

As gorduras são largamente utilizadas na dieta dos animais de companhia como fornecedores de energia e como promotoras de características sensoriais, conferindo cor, textura e sabor aos alimentos (SILVA et al. 1999). Além disso, as fontes de gordura fornecem ácidos graxos essenciais que são compostos primordiais para a saúde dos animais (FRANÇA et al., 2011).

Os ácidos graxos essenciais estão associados a funções neurológicas, estruturais, e de transporte de vitaminas lipossolúveis. Também servem de fluído para as membranas celulares e estão relacionados com a manutenção da saúde da pele e pelagem dos animais (NRC, 2006).

Esses elementos são constituídos por carbono, hidrogênio e oxigênio, sendo classificados pelo tamanho de sua cadeia carbônica (curta, média, longa ou muito longa) as quais variam de 2-36 carbono, podendo ser saturadas (sem ligações duplas) ou insaturadas (presença de ligações duplas) (ARAÚJO, 2011).

Alguns ácidos graxos da série ômega-6 e ômega-3 não são sintetizados pelo organismo e por isso são essenciais na dieta para cães e gatos (linoleico, araquidônico, ácido α -linolênico, EPA e DHA) (NRC, 2006).

Algumas fontes de gordura utilizadas em *pet food* são: gordura de frango, sebo bovino, banha suína, óleo de peixe, óleo de abacate, óleo de palma, óleo de linhaça, óleo de girassol e óleo de soja (ABINPET, 2017). Apesar da grande importância, esses ingredientes possuem elevada susceptibilidade aos processos oxidativos (HILTON, 1989).

Antioxidantes são substâncias que retardam o aparecimento de alterações oxidativas nos alimentos. São compostos aromáticos que contêm no mínimo uma hidroxila, que podem ser sintéticos ou naturais, tais como organosulfurados, fenólicos e terpenos (XAVIER, 2017).

Os antioxidantes podem ser naturais ou sintéticos, os naturais são extratos vegetais, os sintéticos são os mais utilizados na indústria de alimentação animal, como o BHT (Butilhidroxitolueno), BHA (Butilhidroxianisol), TBHQ (Terc-butilhidroquinona), PG (Propilgalato) e o toxiquim (MENDES, 2011).

Para os antioxidantes poderem ser utilizados na alimentação animal, devem seguir as seguintes qualificações (MENDES, 2011).:

1. Devem ser eficazes na conservação de gordura de origem animal e vegetal, vitaminas e outros alimentos que estão sujeitos à destruição oxidativa;
2. Não deve ser tóxico ao homem e aos animais domésticos;
3. Deve ser eficaz em baixas concentrações;
4. Deve ser economicamente viável.

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos, sendo que os primários, são os mais utilizados em *pet food*. Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia. Os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas, como glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases; os agentes quelantes/sequestrantes complexam íons metálicos, principalmente, cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Os mais comuns são: ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA);

os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais e são amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, derivados de ácido cinâmico (ácido caféico) e flavonoides (DAVY, 2009).

Antioxidantes também podem ser definidos como qualquer substância que, quando presentes em baixas concentrações comparadas àquelas de um substrato oxidável, atrase ou previna significativamente a oxidação desse substrato (ZICKER, 2010).

De acordo com Halliwell et al. (1995), os antioxidantes são interessantes do ponto de vista clínico e biológico, pois conferem proteção ao corpo humano contra danos causados por espécies reativas de oxigênio. Os radicais livres gerados in vivo prejudicam muitos alvos além dos lipídios, incluindo proteínas, DNA e pequenas moléculas.

A oxidação lipídica é considerada a deterioração mais importante que ocorre nos alimentos, pois afeta sua qualidade – principalmente o aroma, o sabor e o valor nutricional, além de resultar na produção de compostos tóxicos (AMENSOUR et al., 2010).

O efeito do antioxidante no controle da oxidação de lipídios consiste na inativação dos radicais livres, por meio dos doadores de hidrogênio e elétrons (HILTON, 1989), e de forma secundária, na complexação de íons metálicos, inativação das espécies reativas de oxigênio, transformação de hidroperóxidos em espécies não radicalares. Dessa forma, as reações de oxidação lipídicas do alimento podem ser controladas (ARAÚJO, 2011).

Assim, a prevenção dos danos oxidativos que possam ocorrer durante o armazenamento das rações até o momento do consumo, com a adição de antioxidantes aos ingredientes ou às rações, permite a manutenção dos valores nutricionais e energéticos das dietas (FISCHER et al., 2005).

3.2.1 Antioxidante Sintético

Os antioxidantes são as substâncias responsáveis por retardar o aparecimento de alterações oxidativas no alimento (ANVISA, 1999). O BHA, BHT e TBHQ são os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos. A estrutura fenólica destes compostos permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando, assim, a molécula do acil-glicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por

radicais livres (RAMALHO & JORGE, 2006).

O BHA é um antioxidante mais efetivo na supressão da oxidação em gorduras animais do que em óleos vegetais (BAILEY, 1996). O BHT possui propriedades similares ao BHA e são sinergistas entre si. O BHA age como sequestrante de radicais peróxidos, enquanto o BHT age como sinergista ou regenerador de radicais BHA (MADHAVI, 1995).

No Brasil, o Ministério da Saúde limita o uso destes antioxidantes, como concentrações máximas permitidas em 200 mg/kg para BHA e TBHQ e 100 mg/kg para BHT. Já para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016) e segundo o Jornal Oficial da União Europeia (OJEU, 2003), a mistura de etoxiquina com BHA e/ou BHT é autorizada desde que a concentração total da mistura não exceda 150 mg/kg de alimento final para o consumo dos animais.

3.2.2 Antioxidante Natural

Os antioxidantes sintéticos, por motivo de risco potencial à saúde humana, vêm sendo substituídos por antioxidantes naturais provenientes de várias fontes vegetais, considerados mais seguros à saúde. Os principais oxidantes naturais, amplamente utilizados, são os tocoferóis (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C). A vitamina E é considerada um antioxidante e atua na etapa de propagação e terminação da oxidação lipídica, reagindo com os radicais livres e/ou sequestrando a molécula de oxigênio. Os ácidos ascórbico, cítrico e fítico atuam na oxidação lipídica como agentes quelantes ou sequestrantes e são considerados antioxidantes secundários (CONEGLIAN, 2011).

As pesquisas por novos antioxidantes naturais têm aumentado nos últimos anos, levando as indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêuticas a terem maior atenção em novas fontes de antioxidantes naturais. Os compostos antioxidantes naturais são isolados de diferentes partes de plantas tais como sementes, frutas, folhas e raízes (ADEGOKE, 1998).

Os antioxidantes naturais podem funcionar como agentes redutores, como inibidores de radicais livres, como quelantes ou sequestrantes do oxigênio e como desativadores de metais pró-oxidantes (RICE-EVANS et al., 1995; KÄHKÖNEN *et. al.*, 1999).

Uma das características dos antioxidantes é retardar o desenvolvimento de

sabores e odores desagradáveis ocasionado pela oxidação de ácidos graxos insaturados, usualmente presentes como triacilgliceróis e/ou lipídeos polares, há uma tendência geral, no processamento de alimentos, de substituir os antioxidantes sintéticos pelos inibidores da oxidação natural ou pelo uso preferencial de ingredientes que naturalmente possuem atividade antioxidante (TSALIKI et al.,1999).

Entre os antioxidantes naturais, os tocoferóis lipossolúveis têm sido estudados extensamente, mas o interesse na pesquisa por novos antioxidantes naturais tem aumentado nos últimos anos. O reino vegetal é rico em compostos fenólicos, os quais são encontrados em especiarias e folhas de plantas aromáticas de regiões quentes e secas (ECONOMOU *et. al.*, 1991). Extratos crus de frutas, ervas, vegetais, cereais e outros materiais ricos em fenólicos são de interesse na indústria de alimentos, pois estes retardam a degradação oxidativa de lipídeos, melhorando deste modo a qualidade e o valor nutricional dos alimentos.

3.3 Métodos de determinação de *shelf life*

Para determinação da *shelf life* de um alimento é necessário conhecer as principais reações de transformação e fatores envolvidos no processo de deterioração. Os fatores de maior relevância são a influência da temperatura, umidade relativa, atividade de água e luz (DIAS, 2007).

Informações sobre *shelf life* de novos produtos alimentícios são requeridas durante o desenvolvimento e para o lançamento no mercado. No entanto, muitos produtos têm *shelf life* prolongada, o que dificulta a determinação experimental em tempos compatíveis com as programações comerciais da empresa. Para essas situações, a aplicação de Testes Acelerados de *Shelf life* (TAVP) se apresenta como uma alternativa interessante (VITALI & NETO, 1996).

Normalmente as empresas deparam-se com três cenários possíveis para o cálculo do *shelf life*. Um que corresponde a condições ótimas de manipulação e armazenagem, o que gera uma validade elevada, outro onde alguns abusos na manipulação e armazenagem são admitidos, e finalmente, um cenário onde o alimento passa por condições adversas de manuseio e acondicionamento. Por norma, o primeiro e último cenário são ignorados, pois se no primeiro as condições admitidas são inatingíveis devido à sua excessiva perfeição, o último ocasiona um subaproveitamento do *shelf life* potencial do alimento. Deste modo, opta-se pelo cenário intermédio, no qual muitas empresas, como margem de segurança extra, optam por dar cerca 75% da validade calculada ao alimento (DIAS, 2007).

O *shelf life* é normalmente estimado com base em produtos semelhantes existentes no mercado ou em registros existentes. No entanto, para um alimento que se deve determinar o seu *shelf life*, a maneira mais comum e direta é simular as condições desde a armazenagem, distribuição, exposição e uso por parte do consumidor registrando a sua evolução e alterações ao longo do tempo. Este tipo de determinação é admissível para produtos com validades pequenas, mas para produtos com validades grandes precisa de uma grande disponibilidade de tempo e dinheiro para as sucessivas análises, algo que as empresas não têm ou não querem empregar, mas por motivos de exigência do consumidor e concorrência as empresas são obrigadas a colocar produtos novos o mais breve possível no mercado e têm que se determinar o *Shelf life*, e por motivos óbvios de controle de gastos a alternativa que

se é encontrada é utilizar métodos rápidos de determinação o *shelf life* nos quais o alimento é acondicionado perante condições físico-químicas que aceleram a sua deterioração (DIAS, 2007).

O *shelf life* pode ser mensurado de várias maneiras, basicamente os métodos se dividem em teste em tempo real e testes acelerados. O teste em tempo real se baseia em uma avaliação durante todo o tempo de vida útil do alimento. No caso de alimentos voltados a animais de companhia, essa avaliação teria a duração de 12 meses podendo se estender a 18, dificultando a produção em escala industrial. Normalmente o *shelf life* em tempo real, monitora as alterações sofridas pelo alimento em função a oxidação por meio de análises como: índice de peróxido, índice de acidez, análises sensoriais, dienos conjugados, TBARS, entre outras (DROZDOWSKI & SZUKALSKA, 1987).

Como avaliar a estabilidade oxidativa de um alimento em tempo real pode ser um processo demorado, como no caso de alimentos secos e extrusados para cães e gatos, os testes acelerados são fortemente empregados. Recorrendo a condições padronizadas de oxidação acelerada (oxigenação intensa, tratamento térmico ou catálise por metais) para provocar o envelhecimento mais rápido dos alimentos os testes acelerados permitem estimar de forma rápida o *shelf life* (SILVA et al., 1999).

Basicamente, os testes acelerados consistem em avaliar a estabilidade de alimentos expostos a condições abusivas de estocagem, a fim de reduzir o tempo requerido para se determinar o *shelf life*. Os testes acelerados representam um recurso muito útil diante da escassez de dados cinéticos de degradação de sistemas complexos, como grande parte dos alimentos (AZEREDO & FARIA, 2004).

Os testes acelerados (sob altas temperaturas) são usados há várias décadas. Geralmente, os alimentos são estocados a 37 °C e 51 °C, e várias correlações (baseadas na Equação de Arrhenius ou no conceito de Q_{10}) são usadas para extrapolar os resultados para as temperaturas usuais de estocagem. Quando se deseja mais precisão, usam-se várias temperaturas elevadas de estocagem, determinando fundamentos de estabilidade de alimentos se, experimentalmente, o valor de Q_{10} ou a energia de ativação (SAGUY & KAREL, 1980).

Para alguns testes acelerados também é necessário o monitoramento da evolução oxidativa através de análises. Um método acelerado com tratamento térmico bastante empregado para avaliar *shelf-life* de alimentos é o método de estufa, também chamado de método de SchAwl. Esse método envolve o aquecimento das amostras

em temperatura de 60°C em estufa de ventilação forçada, até o aparecimento dos primeiros sinais de oxidação (HILL, 1994; SILVA et al., 1999). As amostras são avaliadas em intervalos regulares de tempo, empregando o uso de metodologias como peróxido ou até mesmo análises sensoriais (SILVA et al., 1999).

Entre os testes acelerados que utilizam oxigenação intensa se destacam o Oxitest, Oxipres e Rancimat, ambos são reatores capazes de medir a capacidade de estabilidade oxidativa de alimento. Nesses métodos, qualquer composto oxidável irá reagir com o oxigênio (SILVA et al., 1999), sendo possível identificar o ponto em que a amostra perde sua estabilidade, chamado de período de indução (PI), coincidindo com a fase de propagação (fase II) da autooxidação lipídica (O'KEEFE et al., 2010).

Métodos como esses são práticos e bem mais rápidos que o método de estufa, outra vantagem seria a falta da necessidade de acompanhar a evolução oxidativa por meio de análises do grau de oxidação. O período de indução dos alimentos submetidos a esses testes é registrado pelo equipamento. No entanto, o fluxo de oxigênio utilizado é muito mais alto que o oxigênio ambiente o que diminuiria a correlação com teste em tempo real (SILVA, 2018).

3.3.1 Teste sob condição ambiente

Em teste de *shelf life* em condições ambientes o produto geralmente é colocado em uma câmara de temperatura constante igual à média das temperaturas máximas e mínimas diárias no mês mais quente do ano e no local mais quente onde é distribuída quantidade significativas do produto. Quando um produto é distribuído sob temperatura controlada (ar-condicionado, refrigerado, congelado), a temperatura escolhida deve ser a máxima encontrada com frequência no sistema de distribuição (VITALI & NETO, 1996).

3.3.2 Teste sob condição acelerada

O uso de Testes Acelerados de *Shelf life* (TAVP) permite, em um tempo de estudo reduzido, estimar a *shelf life* do produto de interesse, em diferentes condições de armazenamento. Com base no modelo de Arrhenius podem-se calcular os parâmetros cinéticos, energia de ativação (E_a) e o fator de aceleração da temperatura (Q_{10}), os quais descrevem quão rapidamente uma reação irá ocorrer, se um produto

for mantido a uma outra temperatura, incluindo as temperaturas de abuso. Se o valor de Q_{10} for conhecido, ele pode então ser usado na extrapolação da *shelf life* para temperaturas inferiores, tais como aquelas encontradas durante a comercialização (GRIZOTTO, *et al.* 2006).

O aumento do *shelf life* resultante Q_{10} é uma forma alternativa de expressar a dependência de uma alteração a mudanças de temperatura, muito usada pela indústria de alimentos, é o valor de Q_{10} , definido como a relação entre constantes de reação para temperaturas diferindo da redução da temperatura em 10°C (LABUZA, 1982).

Na prática, a validade da Equação de Q_{10} restringe-se a intervalos relativamente estreitos de temperatura. A obtenção de Q_{10} , a partir de uma faixa ampla de temperaturas, pode fornecer resultados errôneos (BOEKEL, 2008).

Segundo TAOUKIS *et al.* (1997), o valor de Q_{10} conduz a uma equação de taxa de reação em função da temperatura, na forma:

$$K(T) = k_0 e^{Bt} \quad (1)$$

E o Q_{10} relacionado com a energia de ativação, segundo a seguinte equação:

$$\frac{\ln Q_{10} = \frac{10 E_A}{RT(T+10)}}{\quad} \quad (2)$$

O valor z é um termo muito usado para representar a dependência da temperatura em cinética de inativação de microrganismos. O valor z equivale à diferença de temperatura que determina uma variação de dez vezes na velocidade da alteração. A relação entre Q_{10} e z é a seguinte:

$$Z = \frac{10}{\log Q_{10}} \quad (3)$$

Outra forma de se determinar mais rapidamente o *shelf life* é utilizando modelos de previsão baseados em relações matemáticas e estatísticas. Estes modelos são utilizados especialmente para avaliar a evolução microbiológica no alimento e dependem de três fatores: fatores intrínsecos, relacionados com produto, onde o pH (potencial hidrogeniônico) e a A_w (atividade de água) são as variáveis mais importantes, fatores extrínsecos relacionados com o ambiente, na qual a temperatura é a variável mais importante e fatores implícitos relacionados com o comportamento

dos microrganismos perante a combinação dos fatores intrínsecos e extrínsecos. Isto significa que combinando valores de pH, Aw e temperatura, poderá ser proporcionado condições para um maior desenvolvimento microbiológico no alimento, ou pelo contrário, inibir o seu crescimento (DIAS, 2007).

Nestes testes os produtos precisam ser protegidos contra o ganho e perda de umidade pois a umidade relativa do ambiente não só varia com a hora do dia e época do ano como principalmente com a localidade. Em alimentos desidratados a sua atividade de água ou umidade relativa de equilíbrio é baixa, geralmente inferior a 30% ($A_w=0,30$). Como a umidade relativa do ar no Brasil só excepcionalmente é inferior a 30%, concluímos que a proteção do alimento contra a absorção de umidade é fundamental (VITALI & NETO, 1996).

A cinética das reações identifica os principais parâmetros que afetam a velocidade de uma reação e estabelece relações quantitativa, e cada cinética de reação tem suas leis expressas por meio de equações baseadas em conceitos. Segundo Vitali e Neto (1996), a velocidade de uma reação pode ser definida como:

$$r = \frac{dC}{dt} \quad (4)$$

Sendo:

C = concentração do componente ou nota de um atributo;

t= tempo de reação;

r = velocidade da reação

Além da velocidade da reação, também é importante se definir o modelo matemático que permita descrever a cinética da reação de degradação. Podendo se ter reações de ordem zero, primeira ordem, segunda ordem, e assim por diante (VITALI & NETO, 1996).

As reações de primeira ordem são as mais comuns em alimentos, sendo existente uma série de reações que seguem esse mecanismo como, por exemplo, o crescimento e morte de microrganismos, a destruição de vitaminas e pigmentos durante o processamento e armazenamento, destruição de toxinas por aquecimento e rancidez em óleos (MARTINS, 2009).

O efeito da temperatura sobre as transformações em alimentos é importante quando se deseja manter a sua qualidade. O conhecimento quantitativo do efeito da temperatura sobre a velocidade de deterioração dos alimentos é muito importante na

sua comercialização, pois permite estimar a *shelf life* de produtos com base em testes acelerados de *shelf life* (VITALI & NETO, 1996).

A velocidade das transformações em alimentos é diretamente proporcional ao aumento da temperatura, contudo conforme a faixa de temperatura estudada, os mecanismos ou mesmo o tipo de transformação podem mudar completamente, sendo assim a equação de Arrhenius é a forma mais universalmente aceita, onde se consegue uma representação amplamente utilizada para representar os efeitos da temperatura nessas transformações (VITALI & NETO, 1996).

Matematicamente a equação de Arrhenius é escrita como:

$$\frac{d(\ln k)}{dT} = \frac{E}{R \times T^2} \quad (5)$$

Sendo:

T = temperatura absoluta

E = energia de ativação aparente

R = constante dos gases

K = constante da velocidade de reação

Integrando a equação (5) em intervalos definidos, obtém-se:

$$\ln k = \frac{-E}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) + \ln k_0 \quad (6)$$

Sendo:

E= energia de ativação (kcal/mol);

T= temperatura absoluta final;

T₀= temperatura absoluta referência;

K= constante de velocidade da reação.

Desta forma, plotando-se em escala linear o valor do logaritmo da constante da velocidade de uma reação, em função do inverso da temperatura absoluta, obtém-se uma linha reta quando esta segue a equação de Arrhenius. A inclinação da reta traçada representa E/R (energia de ativação aparente/constante dos gases) e, assim, pode-se obter a energia de ativação da reação (VITALI & NETO, 1996).

O uso de E (energia de ativação aparente) e do Q₁₀ permite uma aplicação racional do tratamento térmico e da manipulação das temperaturas de estocagem. É

necessário conhecer o mecanismo de deterioração dos alimentos para não fazer estimativas incorretas, já que a energia de ativação pode variar quando se investiga um grande intervalo de temperaturas. Tal fenômeno é comum para reações oxidativas, investigadas em altas temperaturas (acima de 100°C). Nessas temperaturas, a energia de ativação total corresponde a várias reações sequenciais. Portanto, estudos de estabilidade de alimentos em temperaturas elevadas, ou por testes acelerados para estimar a vida útil poderão causar estimativas erradas da estabilidade real, ou seja, podendo sub ou superestimar a *shelf life* do alimento (FARIA et al., 2008).

O TAVP consiste no armazenamento do produto de interesse sob condições ambientais definidas e controladas de forma a acelerar as taxas de transformação, sendo que tais taxas são estabelecidas através da conversão dos dados existentes em parâmetros cinéticos. As taxas aceleradas de transformação determinadas são relacionadas àquelas obtidas sob condições normais de armazenamento. Dessa forma para a condução do TAVP do produto em questão devem ser definidos as temperaturas de teste, a escala de tempo e os intervalos de amostragem. Esses tempos podem ser empregados como os intervalos das avaliações do *shelf life* (VITALI & NETO, 1996).

Existem alguns problemas práticos e erros teóricos no uso de TAVP, entre eles destacam-se os erros analíticos, principalmente os subjetivos; as mudanças de fase, como fusão e cristalização, que podem acelerar reações mascarando os resultados; o uso do congelamento para armazenamento das amostras, podendo causar concentração dos solutos resultando em aceleração de reações; a redução na solubilidade dos gases com o aumento da temperatura, mascarando resultados; o uso de embalagens não herméticas que podem causar desidratação ou ganho de umidade, modificando as velocidades de reação; o armazenamento em temperaturas excessivamente elevadas podendo causar desnaturação de proteínas e indução de outras reações não esperadas ou previstas, mascarando totalmente a previsão de *shelf life* (MARTINS, 2009).

Além disso, deve-se lembrar que as condições reais de distribuição dos alimentos são diferentes das condições estáveis de laboratório. Os produtos alimentícios são expostos, em geral, a flutuações de temperaturas na cadeia de distribuição, resultado em *shelf life* menor do que a prevista por testes estáticos. Desta forma, se as condições de distribuição são conhecidas, para resultados mais precisos, testes dinâmicos com oscilações de temperatura são recomendados para

determinação do *shelf life* real do alimento (MARTINS, 2009).

3.4 Alimento Semiúmido extrusado

Os alimentos semiúmidos são alimentos que possuem umidade entre 13 e 25%, mas são pouco comuns no mercado brasileiro (MANUAL PET FOOD, 2019). São produzidos por um processo com ausente ou parcial secagem. Apresentam umidade entre 12 e 30%, porém a sua atividade água não deve ultrapassar o valor de 0,85; considerando que todo o alimento é semiúmido. Neste processo geralmente é necessário o uso de secadores e/ou resfriadores; e o alimento ainda pode passar por processo de recobrimento, onde ele pode receber gordura animal, palatilizantes, etc.

O processo de extrusão é o mais utilizado, mas outras tecnologias também podem ser empregadas para obtenção de alimentos semiúmidos, sendo esta etapa a principal no que se refere à eliminação dos perigos microbiológicos das matérias-primas utilizadas na fabricação do alimento, uma vez que os ingredientes de origem animal possuem maior suscetibilidade quanto à presença e/ou desenvolvimento de *Salmonella sp.* em função de características intrínsecas e tecnologias de processamento (MANUAL PET FOOD, 2019).

O processo de extrusão é um processo caro, que consiste basicamente em adicionar água e vapor ao alimento pulverizado em um pré-condicionador com tempo de permanência controlado e submetê-lo a um canhão com temperatura e velocidade de rosca controlada para aumento de pressão e tempo de permanência, visando o máximo de gelatinização do amido. Ao final desse canhão, o alimento é submetido à pressão atmosférica e tende a expandir, sendo que o grau de expansão pode ser controlado pela diferença entre a pressão interna e externa na saída do extrusor, características de ingredientes e teores de água, vapor ou óleo adicionados (MANUAL PETFOOD, 2019).

Os bifinhos possuem alto teor de proteína, em torno de 40%; porém também é uma boa fonte mineral e energética. Parte desta energia provém do conteúdo de carboidrato e lipídios presentes em sua composição. Seu processamento é feito através da extrusão, que combina alta pressão, umidade e altas temperaturas (SILVA, 2017).

3.5 Fatores que interferem na determinação do *shelf-life*

De acordo com a *Food Ingredients Brasil*, os fatores intrínsecos são as propriedades do produto, e isso inclui: atividade da água (a_w) (água disponível), valor de pH, acidez total, potencial redox, oxigênio disponível, nutrientes, composição química do alimento, bioquímica natural da formulação do produto (enzimas, reagentes químicos), uso de conservantes na formulação do produto (por exemplo, sal, antioxidantes). Estes fatores intrínsecos são influenciados pelo tipo de matéria-prima, qualidade dos ingredientes e processamento pelo qual o alimento é submetido. Já os fatores extrínsecos são aqueles que o alimento encontra à medida que o mesmo se move na cadeia alimentar. Sendo esses: perfil e tempo de temperatura durante o processamento, UR (umidade relativa) do processamento, armazenagem e distribuição, exposição à luz (UV e IV) na armazenagem e distribuição, controle de temperatura do processamento e da temperatura ambiente na armazenagem, composição da atmosfera dentro da embalagem e por fim o manuseio do consumidor (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2011).

Esses processos podem ser convenientemente classificados como microbiológicos, químicos, físicos e relacionados à temperatura, podendo causar assim o aumento ou a diminuição da *shelf life* de determinado alimento (SILVA, 2018).

As alterações microbiológicas que os alimentos podem sofrer dependem de diversos fatores, sendo os que mais se destacam: a carga microbiana inicial no começo do armazenamento; as propriedades físico-químicas dos alimentos, como teor de umidade, pH e presença de conservantes; o método de processamento utilizado na produção dos alimentos; e o ambiente externo do alimento, como as composições de gás circundantes e a temperatura de armazenamento (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2011).

A absorção de água é a principal alteração física com capacidade de afetar o *shelf life*. À medida que quanto maior a absorção, mais rapidamente o alimento pode deteriorar, interferindo diretamente em seu tempo de vida útil (KRABBE & SANDRI, 2012).

A oxidação lipídica influencia negativamente a qualidade dos alimentos, representando o principal fator que provoca odores e sabores desagradáveis, com possibilidade de formação de compostos nocivos afetando o *shelf life* de produtos alimentícios, incluindo alimentos para animais de companhia (CALLIGARIS et al.,

2008; CHANADANG et al., 2016, SILVA et al., 2017).

Muitas alterações deteriorantes importantes podem ocorrer decorrentes de reações dentro do alimento ou a partir de reações dos componentes dos alimentos com fatores externos, por exemplo, o oxigênio. O desenvolvimento de rancidez é um fator importante em alimentos que contêm gordura, e pode ocorrer através de diferentes mecanismos, como por exemplo, reações lipolíticas/hidrolíticas, reações oxidativas, e reações de reversão do sabor (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2015).

3.5.1 Desenvolvimento de microrganismos

Os microrganismos que contaminam os alimentos, podem ser de diversas fontes de contaminação sendo provenientes do solo, água, plantas, utensílios, trato intestinal do homem e dos animais, manipuladores de alimentos, ração animal, pele dos animais, ar e pó. Onde os microrganismos de interesse em alimentos se compreendem aos fungos, bactérias e aos vírus. Dependendo do tipo de interação com o alimento, os microrganismos podem ser classificados em três categorias (FRANCO & LANDGRAF, 2008):

Deterioradores – Que promovem alterações químicas resultantes da atividade metabólica dos microrganismos, que se desenvolvem em compostos do alimento como fonte de energia, comprometendo a qualidade do produto, geralmente do ponto de vista sensorial (aparência, odor, sabor e textura).

Patogênicos – Que promovem o desenvolvimento de infecções ou intoxicações no indivíduo que consumir o alimento contaminado.

Fermentadores – Que promovem reações químicas específicas, as quais produzem alterações desejáveis em alimentos, modificando suas características sensoriais. É o caso dos microrganismos usados na produção de queijos, vinhos e pães, entre outros.

Alimentos comercialmente esterilizados e acondicionados em embalagens metálicas ou de vidro podem sofrer deterioração microbiológica, caso o tratamento térmico seja insuficiente ou quando ocorrerem falhas na hermeticidade da embalagem, permitindo a entrada de microrganismos. Para produtos pasteurizados, as alterações microbiológicas dependem das características do alimento, da carga microbiana sobrevivente ao tratamento térmico e de contaminações após o processamento e da temperatura de estocagem (AZEREDO, 2012).

O alimento é uma fonte importante de contaminação microbiológica e para sua conservação geralmente sofre processamentos visando à diminuição dos microrganismos deterioradores e a eliminação dos patogênicos. Os processos são normalmente definidos em função de parâmetros como pH, atividade de água, potencial de oxirredução e natureza química do alimento, uma vez que eles condicionam as características dos microrganismos presentes no alimento. Também são muito importantes o nível de contaminação inicial, bem como o nível máximo final admissível para o seu consumo seguro (VITALI & NETO, 1996).

3.5.2 Reações químicas enzimáticas

Normalmente durante o processamento dos alimentos, as estruturas internas são rompidas, danificando as membranas celulares e colocando em contato com várias substâncias químicas, dando início, muitas vezes, a reações indesejáveis. As enzimas presentes, senão forem devidamente inativadas, podem agir como catalisadores destas reações, dando origem à cor, textura, sabor e odor indesejáveis. É importante dispor de dados sobre a atividade das diferentes enzimas nos alimentos e dos parâmetros cinéticos de sua inativação em função do pH, temperatura e atividade de água, para que se possa projetar processos seguros de inativação. As enzimas, quando ativas, têm uma dependência muito grande da atividade de água do alimento para a sua atuação (VITALI & NETO, 1996).

Fatores como pH (potencial hidrogeniônico), A_w (atividade de água) e temperatura, afetam as taxas de alterações enzimáticas. A ação de enzimas ocorre em limites estreitos de pH, cada enzima tendo sua faixa de pH de ótima atividade, acima ou abaixo da qual a atividade diminui ou cessa. A atividade enzimática aumenta com o aumento da temperatura, até um valor ótimo, a partir do qual as enzimas são inativadas. Em alimentos, as alterações enzimáticas podem ser minimizadas por tratamentos térmicos que inativem as enzimas (AZEREDO, 2012).

Muitos alimentos contêm enzimas em atividade, que podem causar descoloração, mudanças na textura e no sabor, rancidez, entre outras alterações. Para qualquer alimento contendo enzimas ativas, uma medida de proteção consiste em reduzir a temperatura de armazenagem, proteger contra ganho de umidade e contra o contato com O_2 . A água promove a reatividade enzimática de várias formas, destacando-se o aumento da mobilidade de enzimas, a estabilização da estrutura e

configuração enzimáticas, além da função de reagente em reações de hidrólise. Genericamente, pode-se dizer que as enzimas mais importantes em alimentos (amilases, fenoloxidasas, peroxidases) são completamente inativas a A_w (atividade de água) inferior a 0,85, com exceção das lipases, que permanecem ativas a valores baixíssimos de A_w (até mesmo 0,1) (AZEREDO, 2012).

3.5.3 Reações químicas não enzimáticas

3.5.3.1 *Escurecimento não enzimático*

O escurecimento não enzimático ocorre por meio de uma série de reações complexas sempre que estejam presentes no alimento um composto redutor (aldose/hexose) e um grupo aminado (aminoácido/proteína), resultando em sabor amargo, pigmentado escurecido, perda da digestibilidade/solubilidade de proteínas e sabor/odor envelhecido. É importante em alimentos desidratados e principalmente em alimentos de umidade intermediária, sendo desprezível em alimentos de elevada umidade como a maioria dos enlatados. É altamente dependente da temperatura, sendo que em temperaturas acima de 35 °C muitas vezes é a reação de deterioração predominante para faixas intermediárias de atividade de água (VITALI & NETO, 1996).

Estas reações também são muito lentas em valores de atividade de água baixos, embora maiores quando comparadas às reações enzimáticas. Em teores intermediários de umidade, correspondentes à faixa de atividade de água 0,6 e 0,8, atingem um valor máximo de velocidade. Os alimentos desidratados também são sujeitos a estas reações, embora numa velocidade menor. O ponto de máxima degradação da qualidade pode mudar, dependendo do tipo de aminoácidos presente (VITALI & NETO, 1996).

3.5.3.2 *Oxidação de lipídeos*

Os processos de oxidação e redução estão relacionados com a troca de elétrons entre compostos químicos. O potencial de oxirredução pode ser definido como sendo a facilidade com a qual determinado substrato ganha ou perde elétrons. Quando um elemento perde elétrons, ele é dito oxidado, e quando ganha elétrons, reduzido. Quando ocorre a transferência de elétrons de um composto para outro,

estabelece-se uma diferença de potencial entre os mesmos, a qual pode ser medida com instrumentos apropriados, sendo expressa em volts (V) ou em milivolts (mV). Quanto mais oxidado é um composto, mais negativo é esse potencial. O potencial de oxirredução de um sistema é expresso pelo símbolo Eh. A determinação do valor de Eh de um alimento é bastante difícil porque ocorre a interação da tensão do oxigênio que envolve o alimento com a presença de compostos químicos que agem sobre o valor de Eh (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

A oxidação de lipídeos ocorre por meio de uma série de reações entre gorduras insaturadas e oxigênio. Também são reações complexas em cadeia, envolvendo mecanismos de formação de radicais livres e dando origem a produtos voláteis de baixo peso molecular, como aldeídos, cetonas, ácidos e álcoois. Alguns destes produtos em quantidades diminutas (2-3 ppm) já conferem odor ruim ao alimento. Além disso, estas reações dão origem a vários produtos intermediários dos radicais livres, os quais podem reagir com proteínas, causando perda de solubilidade ou do seu valor biológico, com pigmentos solúveis em óleo, como os carotenoides, causando perda de coloração e vitaminas tais como A, C e E, determinando perda de sua eficácia. Outras reações ainda podem ocorrer levando a perdas na qualidade do alimento e até formação de compostos tóxicos. Este tipo de reação é muito comum em alimentos desidratados e alimentos congelados, podendo em muitos casos representar o principal mecanismo de deterioração (VITALI & NETO, 1996).

Durante a estocagem de alimentos, as alterações químicas indesejáveis em alguns produtos englobam a degradação de sabor, cor e textura, a deterioração de propriedades funcionais de compostos, como perda da capacidade de retenção de água por aquecimento de proteínas, a perda de valor nutricional e o desenvolvimento de compostos tóxicos (AZEREDO, 2012).

A oxidação é a alteração mais relevante em óleos e uma das principais causas de deterioração de alimentos. É uma série complexa de reações que afeta, profundamente, a qualidade de óleos, levando ao desenvolvimento de uma alteração sensorial conhecida como rancidez oxidativa, que frequentemente resulta em rejeição do produto (AZEREDO, 2012).

O índice de peróxido é um indicador muito sensível no estágio inicial da oxidação de óleos e gorduras, e sua presença é indício de que a deterioração do sabor e odor, em função de sua estabilidade, está por acontecer. Quando a sua concentração atinge certo nível, mudanças complexas ocorrem, formando compostos

de baixo peso molecular, oriundos de sua degradação. Estes compostos (aldeídos, cetonas, ácidos, álcoois e hidrocarbonetos) são os responsáveis pelo sabor e odor característicos de produtos rançosos. Inevitavelmente são decompostos mesmo à temperatura ambiente, produzindo moléculas pequenas, em especial compostos carbonílicos. Em condições de temperatura elevada, a velocidade de formação dos peróxidos é menor que a de sua decomposição. Portanto esta medição é limitada em razão da natureza transitória do peróxido, isto é, a decomposição em produtos secundários pode subestimar o grau de oxidação, ou seja, baixos valores podem representar o estágio inicial ou avançado de oxidação (ARAÚJO, 1995).

A oxidação lipídica em alimentos é um conjunto complexo, involuntário e inevitável de reações (BARRIUSO et al., 2013).

A oxidação lipídica afeta a qualidade nutricional devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, e é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, o que torna os alimentos impróprios para consumo, prejudicando a qualidade, integridade e segurança dos alimentos devido à formação de compostos potencialmente tóxicos (XIONG, 2000). Além da depleção de qualidade pela degradação de vitaminas e ácidos graxos essenciais, a oxidação lipídica pode causar a formação de 6 compostos tóxicos, como por exemplo, os produtos avançados de lipoxidação (ALEs), sendo estes compostos citotóxicos e genotóxicos (BARRIUSO et al., 2013; CALLIGARES et al., 2015).

Conhecer as modificações no processo de oxidação durante a extrusão se faz importante para o uso racional de aditivos antioxidantes e para definir pontos de inclusão de gordura no processo (RIBEIRO, 2018)

A reação espontânea do oxigênio atmosférico com o lipídeo, conhecido como autooxidação é o processo mais comum de deterioração lipídica. Quanto maior o grau de insaturação, mais propenso está o produto de desenvolver um odor mais forte como resultado da exposição ao oxigênio para formar peróxidos (RIBEIRO, 2018).

O processo de oxidação lipídica é uma preocupação ao utilizar fontes de gordura em *pet food*. As farinhas de origem animal, como a farinha de carne e ossos bovina, farinha de vísceras de frango, farinha de peixes e farinha de suínos, bem como os óleos oriundos destas fontes, devido ao elevado teor lipídico são passíveis de oxidação e, por esse motivo, necessitam de maior atenção. Estes ingredientes compõem aproximadamente 20-40% dos alimentos comerciais e a sua qualidade irá impactar diretamente na *shelf life* do produto acabado (VASCONCELLOS, 2016).

Uma vez iniciada a oxidação é um processo auto catalítico e desenvolve-se em aceleração crescente. Fatores como temperatura, enzimas, luz e íons metálicos podem influenciar a formação de radicais livres (BELLAYER & ZANOTTO, 2004).

Durante o aquecimento dos ácidos graxos ocorre intensa oxidação, diretamente proporcional à temperatura empregada. No entanto, detectar esta decomposição apenas pela análise de índice de peróxido não é suficiente, uma vez que o valor de peróxido cai rapidamente devido à natureza transitória destes compostos, ou seja, o tempo de vida dos peróxidos é baixo e, portanto, o IP pode não ser um indicador adequado (VASCONCELLOS, 2016).

O efeito do sequestro de radicais é determinado não somente pela reatividade do antioxidante com o radical, mas também pela sua concentração. Embora muitos antioxidantes reajam rapidamente com o radical hidroxil (OH), muitas moléculas biológicas, que são mais abundantes que os antioxidantes, reagem também rapidamente com esse radical. Por isso, é praticamente impossível para algum antioxidante sequestrar o OH (JUNIOR, 2019).

A velocidade da reação de oxidação depende, em primeiro lugar, da composição de ácidos graxos do óleo ou da gordura, quanto ao número, à posição e à geometria das insaturações. Para o araquidônico, linolênico, linoleico e oleico a velocidade da oxidação é de aproximadamente 40: 20: 10: 1, respectivamente. Ácido graxo cis oxida mais rapidamente que seu isômero trans, e as ligações não conjugadas são mais reativas que a conjugada. A velocidade de reação de oxidação depende do grau de insaturação na molécula do ácido graxo. Assim, quanto maior o grau de insaturação do óleo e, ou, da gordura, maior será a susceptibilidade à oxidação (ARAÚJO, 2015).

O primeiro composto químico formado quando o processo oxidativo é iniciado é o peróxido (KRABBE & SANDRI, 2012). Os peróxidos são intermediários importantes das reações de oxidação, uma vez que se decompõem via metais de transição, irradiação e temperaturas elevadas para radicais livres (ARAÚJO, 2015).

Após a formação de peróxidos, formam-se outros compostos voláteis (aldeídos, cetonas, ácidos e outros), e, por conseguinte, gera-se a liberação do odor característico de "ranço". Alguns dos problemas resultantes desse processo são a destruição de xantofilas e vitaminas lipossolúveis, diminuição da palatabilidade (devido à presença de aldeídos), perdas no conteúdo de energia e de proteína e o aparecimento de metabólitos tóxicos para os animais (KRABBE & SANDRI, 2012).

Comumente são utilizados diversos métodos para se mensurar a oxidação lipídica, porém, nenhum método isoladamente consegue detectar todos os produtos formados na oxidação de alimentos.

Uma dificuldade em se medir a oxidação lipídica está na escolha do momento mais adequado, por isso é comum determinar um parâmetro indicador, como o período de indução, ou seja, o tempo necessário para se atingir um nível crítico de oxidação (SILVA et al., 1999).

A escolha do método também se apresenta como um gargalo e requer grande importância e atenção, normalmente ela é tomada baseando nas respostas que se deseja obter, como a perda de substratos iniciais, radicais livres, absorção de oxigênio, formação de compostos primários e secundários (SHAHIDI et al., 2002; DOBARGANES & VELASCO, 2002).

Torna-se interessante distinguir métodos de determinação de estabilidade oxidativa nas condições normais de armazenamento (testes de estabilidade oxidativa em tempo real ou *shelf-life*) dos testes de estabilidade acelerado, que avaliam a oxidação por testes preditivos, promovendo os processos oxidativos de maneira acelerada (SILVA et al., 1999).

3.5.3.3 Perda e ganho de umidade

Quando um alimento está em contato direto com o ar atmosférico, a umidade relativa (UR) do ambiente determina a umidade relativa de equilíbrio do alimento. Assim, a absorção ou perda de umidade por um alimento é determinada pelo gradiente entre a umidade relativa do ambiente e a umidade relativa do produto (AZEREDO, 2012).

Há uma correlação estreita entre a atividade de água de um alimento e a umidade relativa de equilíbrio do alimento e a umidade relativa de equilíbrio do ambiente. Quando o alimento está em equilíbrio com a atmosfera, a umidade relativa é igual a atividade de água x 100. Assim, alimentos conservados em ambiente com umidade relativa superior à sua atividade de água tenderão a absorver umidade do ambiente, causando um aumento em sua atividade de água. Por outro lado, os alimentos perderão água se a umidade ambiental for inferior à sua atividade de água, causando uma diminuição nesse valor (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Similarmente ao ganho de umidade, um alimento perderá água (na forma de

vapor) quando sua umidade relativa (atividade de água) for superior à do ambiente. As consequências mais comuns da perda de umidade em alimentos são perda de peso, com prejuízo à textura, murchamento de frutas e hortaliças, endurecimento e recristalização de massas e doces. Uma forma eficaz de minimizar as alterações devidas ao ganho ou perda de umidade é acondicionar o produto adequadamente em embalagens que apresentem boa barreira ao vapor de água. Além disso, deve-se sempre procurar manter a temperatura de estocagem em valores que ultrapassem o mínimo possível a temperatura de transição vítrea, reduzindo, assim, não somente as alterações devidas a transferências de umidade, como também grande parte das alterações químicas e microbiológicas (AZEREDO, 2012).

3.6 Fatores extrínsecos: Condições de armazenamento

3.6.1 Temperatura

O aumento da temperatura geralmente aumenta a velocidade das reações químicas que podem resultar em deterioração. Em alimentos que contêm gorduras, a gordura mais sólida se torna líquida e age como um solvente para as reações em fase de óleo, além disso podem ocorrer mudanças na cristalinidade da gordura. O aumento da temperatura também pode alterar as características de cristalização dos alimentos que contêm xarope de açúcar. A desestabilização de sistemas de emulsão também pode ocorrer sob condições de temperatura flutuante ou agitação mecânica (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2015).

Um dos parâmetros mais importantes no estabelecimento da *shelf life* de um alimento é a temperatura, tanto durante as várias fases dos seu processamento, quanto durante o período de estocagem pré-consumo. A maioria dos processos de preparação e conservação de alimentos conta com a aplicação ou a remoção de calor para a sua efetivação (VITALI & NETO, 1996).

A temperatura é geralmente considerada um fator determinante em relação à *shelf life*, pois afeta consideravelmente a velocidade das reações que ocorrem após o processamento, durante o manuseio subsequente, distribuição e estocagem (PINTO, 2015).

Por exemplo, a oxidação de alimentos ricos em lipídios, reações enzimáticas e degradação de carotenoides são fortemente influenciadas por esse fator de

temperatura sendo de maior importância para a multiplicação de microrganismos. Os microrganismos podem ser classificados em quatro categorias, de acordo com as faixas de temperaturas nas quais podem sobreviver e crescer (AZEREDO, 2012).

Entre os fatores ambientais que afetam a estabilidade de alimentos, o mais estudado é a temperatura, o que se justifica não apenas por seu grande efeito sobre as taxas de reações, mas também pelo fato de ser um fator totalmente imposto pelo ambiente ao alimento, enquanto outros fatores ambientais como a umidade relativa e a pressão parcial de gases podem ser ao menos parcialmente controlados pela embalagem (AZEREDO, 2012).

Por isso, muitos métodos de estimativa de *shelf life* de alimentos baseiam-se na aplicação de modelos cuja principal variável é a temperatura do sistema (AZEREDO, 2012).

3.6.2 Embalagem

A embalagem é fundamental para a preservação da qualidade dos alimentos, tanto frescos quanto processados. Das várias funções da embalagem incluem-se, prevenção de deterioração e contaminação, preservação da qualidade do alimento, proteção física, informação do produto, trazer conveniência e facilitar o transporte e a distribuição (PINTO, 2015).

A embalagem deve controlar os fatores como umidade, oxigênio, luz, servindo como barreira aos microrganismos presentes na atmosfera, impedindo o seu desenvolvimento no produto. Garantindo assim, a qualidade e a segurança do produto, além de prolongar a sua vida útil e minimizar as perdas por deterioração. A embalagem exerce um papel fundamental durante o processamento e conservação do alimento industrializado. Ela é adaptada e moldada a certas tecnologias (BARÃO, 2011).

Alterações físicas nos materiais das embalagens, às vezes, junto com reações químicas, também podem limitar o *Shelf Life* sensorial. Por exemplo, as alterações de permeabilidade com o tempo podem mudar a atmosfera de equilíbrio na embalagem, dando origem a efeitos microbiológicos e químicos. Tais mudanças também podem permitir a migração de compostos voláteis externos para os alimentos, resultando no desenvolvimento de manchas. A migração de componentes químicos do material da

embalagem também pode produzir impurezas, o que pode ser particularmente grave em produtos com um *Shelf Life* longo (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2015).

O uso de embalagem de baixa permeabilidade a oxigênio e luz é uma forma eficaz e muito usada de se evitar o acesso de fatores extrínsecos ao alimento, minimizando, com isso, as reações oxidativas. Assim, para reduzir a oxidação, as embalagens mais adequadas são as metálicas (AZEREDO, 2012).

3.6.3 Luminosidade

A iluminação influencia na oxidação lipídica. Os hidroperóxidos lipídicos são encontrados em todos os alimentos que contêm lipídeos, sendo também encontrados em alimentos quando estes são adicionados como auxiliar em processamento e quando são produzidos por enzimas. Ao serem decompostos, os hidroperóxidos produzem radicais adicionais, um fator que pode ser responsável pelo aumento da oxidação ocorrente em muitos alimentos. A luz ultravioleta (UV) e a luz visível podem promover a decomposição de hidroperóxidos para produzir radicais livres. Logo, embalagens que diminuem a exposição à luz podem atenuar a velocidade da oxidação (PINTO, 2015).

As radiações luminosas, sejam naturais ou artificiais, catalisam reações fotoquímicas em alimentos, principalmente reações de oxidação. Quando o alimento é exposto à luz, a fase de indução é acelerada. A energia luminosa é inversamente relacionada ao comprimento de onda de radiação e a radiação UV tem maior energia radiante que a luz visível, exercendo maior efeito sobre as reações de fotodegradação (FARIA et al., 2008; AZEREDO, 2012).

3.7 Fatores intrínsecos que interferem na *shelf life*

3.7.1 Atividade de água

Um dos fatores mais importantes para sobrevivência dos microrganismos é a disponibilidade de água, medida pela atividade de água (A_w), conceito termodinâmico definido como descrito na Equação 7 (AZEREDO, 2012):

$$A_w = \frac{P}{P_0} = \frac{n_1}{n_1 + n_2} \quad (7)$$

Em que:

P = pressão parcial de vapor da água contida no alimento.

P_o = é a pressão de vapor da água pura, à mesma temperatura.

$n1$ = é o número de moles do solvente (água).

$n2$ = é o número de moles do soluto.

A atividade de água descreve o grau de disponibilidade dessa molécula para atuar como solvente e participar de reações químicas e bioquímicas. Em relação à deterioração de alimentos com base no fator água, o atributo mais importante é sua atividade de água, e não seu teor de umidade, uma vez que o simples teor de umidade não se baseia numa quantificação da água termodinamicamente disponível. Ambos os conceitos se relacionam, e essa relação é expressa em termos de isothermas de sorção (adsorção e desorção) (AZEREDO, 2012).

A água presente nos alimentos pode apresentar-se na forma de molécula livre ou ligada ao substrato. A atividade de água é uma medida que possibilita avaliar a disponibilidade de água livre que é suscetível a diversas reações, sendo que o teor de umidade é uma medida meramente quantitativa, medindo o percentual em peso, de toda a água presente no alimento, tanto livre quanto ligada (PINTO, 2015).

Assim, a atividade de água é a quantidade de água livre que não se encontra comprometida com as moléculas constituintes do produto, que está disponível para as reações físicas, químicas e biológicas, tornando-se o principal responsável pela deterioração dos alimentos. A água ligada interage diretamente com as moléculas constituintes do alimento, não podendo ser removida ou utilizada para qualquer tipo de reação (PINTO, 2015).

O valor de atividade de água tem grande importância na área de tecnologia de alimentos, permitindo avaliar a suscetibilidade de deterioração dos alimentos e, consequentemente, o *shelf life* do produto. A análise de atividade de água fornece valores que permitem maior controle de microrganismos na matéria-prima e produtos industrializados (PINTO, 2015).

3.7.2 Acidez Total

Os ácidos orgânicos presentes em alimentos influenciam o sabor, odor, cor, estabilidade e a manutenção da qualidade. Aa acidez pode ser aplicada para determinar valor nutritivo para manutenção do balanceamento ácido-base no organismo, indicar pureza e qualidade em produtos fermentados, indicar deterioração por bactérias com produção de ácido, indicar deterioração de óleos e gorduras pela presença de ácidos graxos livres e estudar a estabilidade e deterioração do alimento (CECCHI, 1999).

A determinação da acidez pode fornecer um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons hidrogênio. A decomposição dos glicerídeos é acelerada por aquecimento e pela luz, sendo a rancidez quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres. Estes são frequentemente expressos em termos de índice de acidez, podendo sê-lo também em ml de solução normal por cento ou em g do componente ácido principal, geralmente o ácido oleico (INSTITUTO, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em parceria com duas empresas, a Kelco Industrial, fabricante de alimentos para o segmento da nutrição de cães e gatos, e a Kemin Nutrisurance South América, fabricante de antioxidantes para o segmento FEED e FOOD.

Foram produzidos alimentos semiúmidos, denominados bifeinhos, com três diferentes dosagens de antioxidantes, 0,1%, 0,075% e 0,05% (BHA com BHT e Natural), distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em um esquema fatorial (3X2+1) considerando os três níveis de inclusão, e mais um tratamento controle sem antioxidante, totalizando assim 7 tratamentos. Cada tratamento teve 3 repetições, as quais foram geradas a partir da coleta de amostras aleatórias durante o processamento de cada tratamento. As amostras foram estocadas nas condições descritas adiante e analisadas mensalmente.

Os antioxidantes aplicados foram uma mistura de BHA e BHT como tratamento sintético (Pet-Ox Plus Dry, Kemin Nutrisurance, Vargeão, Brasil) e um blend de compostos naturais com princípios ativos provenientes de extrato de chá verde, extrato de alecrim, hortelã e mistura de tocoferóis concentrados (Verdilog IP GT Dry, Kemin Nutrisurance, Vargeão, Brasil).

O alimento semiúmido específico usado foi um produto comercial contendo os seguintes ingredientes: Carne mecanicamente separada de aves (mín. 20%), proteína concentrada de soja*, farinha de arroz, farinha de vísceras de aves, farelo de arroz, fécula de mandioca, glicerina, colágeno, cloreto de sódio (sal comum), açúcar de cana-de-açúcar, ácido fosfórico, corante caramelo IV, sorbato de potássio, aroma natural de fumaça (mín. 0,1%), aroma de churrasco (mín. 0,1%). Espécies doadoras dos genes transgênicos: *Agrobacterium tumefaciens*, *Arabidopsis thaliana*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces viridochromogenes*.

As amostras de bifeinhos (Alimento específico semiúmidos para cães adultos) foram produzidos na unidade da Kelco Industrial em Selvíria – MS em 05/05/2022, por processo de extrusão a quente.

Após a fabricação dos alimentos (7 diferentes alimentos em função da inclusão dos antioxidantes e seus níveis) os mesmos foram acondicionados nas embalagens de distribuição comercial, sendo pacotes de alimento semiúmido para cães adulto,

com peso líquido de 60 g, embalados em filme PET Metalizado (Poliéster Tereftalato) + PE (Polietileno de baixa densidade) + PET Transparente (TPVA 0,95g água/(m².dia) e TPO² 1,02 ml(CNTP)/(m².dia.atm)), recém-fabricados e armazenados em embalagem secundária de papelão para o transporte do chão de fábrica até os laboratórios de qualidade para análises.

As amostras foram coletadas na indústria após o processo e encaminhadas aos laboratórios de controle de qualidade, para análises durante o armazenamento utilizando o método de condições aceleradas.

Conforme a instrução normativa 15/2005 de 09 de maio de 2005 do MAPA, para teste de estabilidade acelerada, os produtos devem ser armazenados em câmara climatizada a 40°C ± 2°C, com monitoramento para 75% ± 5% de umidade relativa, por um período de seis meses, podendo considerar para um prazo de validade provisório de 24 meses. Para estudo de estabilidade de longa duração, para produtos cuja recomendação seja conservar à temperatura ambiente, o teste deve ser conduzido obrigatoriamente, a 30°C ± 2°C/65% ± 5% de umidade relativa. Sendo considerado pela normativa o teste de estabilidade acelerado para determinação de prazo de validade provisório e o teste de estabilidade de longa duração para prazo de validade definitivo.

No presente estudo, a embalagem do produto pode ser considerada de alta barreira, pois dificulta a passagem de umidade do ar ambiente para o produto a uma taxa que não comprometerá o *shelf life* do alimento de teor intermediário de umidade, assim, conforme modelo matemático determinado com base em Vitali (1996), a utilização do parâmetro de temperatura utilizada foi à 40°C (não sendo necessário a determinação e monitoramento da umidade). Caso a embalagem fosse considerada de baixa barreira/permeável, a umidade do ambiente deveria ser controlada a 80% UR), com esta temperatura (40°C) a absorção de umidade é mais rápida, pois a pressão do vapor de água é de 55 mmHg (Pressão do vapor de água na temperatura ambiente 30% UR / Brasil é 32 mmHg). Com base na diferença da pressão do vapor de água, a transferência de umidade através da embalagem é 1,7 vezes (55/32) maior na condição acelerada. Como a permeabilidade dos filmes também aumenta com a temperatura, pode-se esperar que o *shelf life* na condição acelerada seja 2 a 3 vezes mais curta.

Para este estudo considerou-se o produto para 18 meses, ou seja, a cada um mês do produto armazenado em condições aceleradas será considerado três meses

em condições normais, totalizando assim seis meses de estudo, onde as amostras necessárias para cada análise foram retiradas da estufa a cada período de 1 mês.

As análises foram realizadas nos períodos: 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de estocagem nos laboratórios determinados, sendo as análises bromatológicas (Proteína, Extrato etéreo, Matéria Fibrosa, Matéria Mineral, Fósforo e Cálcio) realizadas no laboratório de bromatologia do Departamento de Biologia e Zootecnia da UNESP de Ilha Solteira – SP; as análises físico-químicas (Atividade de água, Umidade, Peróxido e Acidez) no laboratório interno da empresa Kelco Industrial na unidade de Selviria – MS; e as análises de concentração residual de antioxidantes (BHA, BHT, Etoxiquina e Tocoferóis) no laboratório interno da empresa KEMIN na unidade de Valinhos – SP.

As análises microbiológicas (Bolors e Leveduras, *Salmonella sp.*, *E. Coli*, Enterobactérias e Coliformes Termotolerantes) foram realizadas nos períodos: 0, 120 e 180 dias em laboratório em laboratório terceirizado (CBO Análises Laboratórios, Valinhos, Brasil).

Como fator determinante para o final do estudo foi realizada a comparação da diferença dos resultados dados obtidos das análises do dia em que foi fabricado e do último dia que ficou armazenado sob essas condições.

Para verificar se o método de teste acelerado foi eficaz, foi avaliado e analisado a oxidação em tempo real em amostras armazenadas em condição ambiente, as análises de índice de peróxido foram realizadas a cada 30 dias e os resultados comparados com os do teste acelerado.

Cada amostra recebeu uma codificação, sendo formada pela informação da utilização do antioxidante (AS, SI, NA), mais a informação da dosagem recebida daquele antioxidante (010;075;050)

AS: Sem antioxidante

SI: Antioxidante Sintético

Na: Antioxidante Natural

4.1 Análise Estatística

Para o cálculo do tamanho amostral, utilizou-se o software R Core Team (2021). Os critérios estabelecidos para o cálculo foram baseados nos estudos de ABT et al. (2020) e Martínez-Mesa et al (2014) e após várias simulações a mais representativa para o estudo está descrita a seguir.

4.1.1 Delineamento do estudo:

Tratamentos: 2 (Antioxidante Natural e Antioxidante Sintético)

Níveis: 4 (0% - controle; 0,05% - 0,075% - 0,1%)

Tempos de medição: 6 meses (medidas repetidas no tempo)

Grupos: $2 \times 4 = 8$

Alpha(erro): $\alpha = 0,05$

Poder: $(1 - \beta) = 0,95$ e $0,80$.

Tamanho do efeito $f = 0,25$ (Efeito médio) segundo COHEN (1969).

Correlação entre medidas repetidas: $0,5$

4.1.2 Cálculos dos tamanhos amostrais

Tamanho amostral para identificação de diferenças entre os tratamentos (Antioxidante Natural e Antioxidante Sintético) – Efeito Simples.

4.1.2.1 Poder do teste: $0,80$

Parâmetro não central λ : $15,42$

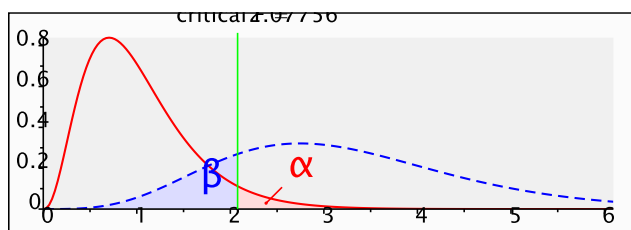
F crítico: $2,07$

Alpha(erro): $\alpha = 0,05$

Poder calculado: $(1 - \beta) = 0,8099$.

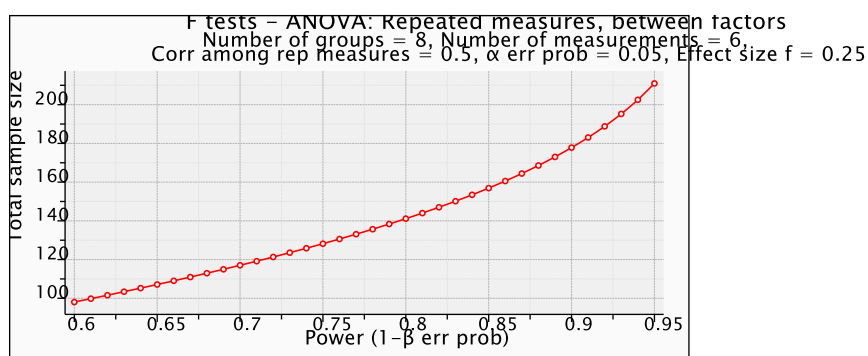
Tamanho total da amostra: 144

- Tratamentos: 2
- Níveis: 4
- Medidas no tempo: 6
- Número de amostras em cada análise: 3 (número de análises em cada período do tempo para cada uma das 8 combinações de tratamento).

Gráfico 01 – F crítico

Fonte: Próprio autor

Gráfico 02 – Poder do teste versus tamanho amostral para efeito de interação entre tratamentos e níveis de antioxidante.



Fonte: Próprio autor

4.1.3 Tamanho amostral:

$N = 144$

Tratamentos = 2

Níveis = 4

Medidas repetidas do tempo = 6

Repetições em cada coleta = 3

$N = 2 \times 4 \times 6 \times 3 = 144$

Poder para efeito simples (Tratamento) $\geq 0,95$

Poder para efeito simples (Níveis) $\geq 0,90$

Poder para efeito da interação (Tratamentos x Níveis) $\geq 0,80$

4.2 Análises Laboratoriais

4.2.1 Análises físico-químicas:

As análises físico-químicas foram executadas no laboratório interno da empresa Kelco Industrial na unidade de Selviria – MS. As amostras foram armazenadas em estufa programada e monitorada à 40°C, e uma vez por mês as amostras necessárias retiradas da estufa para a execução das análises.

Para o processamento foram utilizados seis bifeinhos de cada pacote, tendo cada pacote cerca oito bifeinhos. Os bifeinhos foram homogeneizados em processador de alimentos elétrico e em sequência passados por uma peneira de 1 mm.

As análises físico-químicas realizadas no estudo foram:

- Umidade
- Atividade de água
- Acidez
- Índice de peróxido

4.2.1.1 Análises de Umidade:

A umidade das amostras foi realizada, através do sistema de secagem por infravermelho que são instrumentos de precisão ideais para medir o percentual de umidade de qualquer material. Os resultados são obtidos após algumas operações rápidas e simples, dando o percentual de umidade em base seca, úmida e diferença de peso, controlada pela balança digital. O princípio do método é o aquecimento por infravermelho. A determinação de umidade foi realizada no analisador de umidade por Infravermelho, modelo MB27 HALOGEN, série: 10215278, Marca OHAUS, conforme procedimento do fabricante.

4.2.1.2 *Análises de Atividade de água:*

Determinou-se a atividade de água das amostras utilizando o equipamento da DECAGON, modelo PRE *water activity analyser*, série PRE000854, conforme procedimento do fabricante.

4.2.1.3 *Análises de Acidez:*

Para analisar a acidez do produto, utilizou-se a metodologia segundo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008).

A determinação da acidez pode fornecer um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons hidrogênio. A decomposição dos glicerídeos é acelerada por aquecimento e pela luz, sendo a rancidez quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres. Estes são frequentemente expressos em termos de índice de acidez, podendo sê-lo também em mL de solução normal por cento ou em g do componente ácido principal, geralmente o ácido oleico. Os regulamentos técnicos costumam adotar esta última forma de expressão da acidez. O índice de acidez é definido como o número de mg de hidróxido de potássio necessário para neutralizar um grama da amostra. O método é aplicável a óleos brutos e refinados, vegetais e animais, e gorduras animais. Os métodos que avaliam a acidez titulável resumem-se em titular, com soluções de álcali-padrão, a acidez do produto ou soluções aquosas/alcoólicas do produto, assim como os ácidos graxos obtidos dos lipídios.

4.2.1.4 *Análises de Índice de Peróxido:*

Para analisar o índice de peróxido do produto, utilizou-se a metodologia segundo COMPÊNDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL (2009). O peróxido oxida o iodeto a iodo elementar que, por sua vez forma com o amido um complexo de inclusão de cor característica escura. Os peróxidos são substâncias que apresentam uma ligação oxigênio-oxigênio e que contenham o oxigênio em estado de oxigênio -1. Geralmente se comportam como substâncias oxidantes. A análise é aplicável a

produtos alimentícios secos (farinhas de origem animal e vegetal, rações etc.) ou úmidos (carnes, salsichas, peixes etc.) e óleos e gorduras susceptíveis a oxidação.

4.2.2 Análises bromatológicas:

As análises bromatológicas foram executadas no laboratório de bromatologia do departamento de Biologia e Zootecnia da UNESP de Ilha Solteira – SP. As amostras foram armazenadas em estufa programada e monitorada à 40°C, e uma vez por mês as amostras necessárias foram retiradas da estufa para a execução das análises.

Para o processamento foram utilizados seis bifeinhos de cada pacote, tendo cada pacote cerca oito bifeinhos. Os bifeinhos foram processados de início em um moinho de martelo, em sequência as amostras passadas em uma peneira de 1 mm e a parte retida processada novamente, porém em um moinho de bola até se tornar homogêneo.

As análises bromatológicas realizadas no estudo foram:

- Extrato Etéreo
- Fibra Bruta
- Proteína
- Matéria Mineral
- Fosforo
- Cálcio

Para estas análises utilizou-se as metodologias segundo SILVA & QUEIROZ, 2002.

4.2.3 Análises microbiológicas:

As análises microbiológicas (Bactérias e Leveduras, *Salmonella sp.*, *E. Coli*, Enterobactérias e Coliformes Termotolerantes) foram realizadas nos períodos: 0, 120 e 180 dias em laboratório prestador de serviço CBO Análises Laboratórios em Valinhos – SP, com frequência reduzida devido ao alto custo e logística para execução

destas análises.

Seguem metodologias utilizadas pelo laboratório:

Umidade e Voláteis- MA-003 R3 Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal. 2017. Métodos Analíticos. Método n.53. p.247-248.

Atividade de Água- MA-053 R0 *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists, method* - AOAC, 978.18.

Contagem de Coliformes Termotolerantes e E. coli- MA-137 R4 AOAC OMA - 17.3.04 - 991.14. *Coliform and Escherichia coli Count in food. Dry Rehydratable Film (Petrifilm E. coli/Coliform Count Plate and Petrifilm Coliform Count Plate Methods. 21st ed. 2019. AFNOR - 3M 01/2 - 09/89C Enumeration of thermotolerant Coliforms reading all colonies.*

Contagem de Enterobactérias- MA-139 R3 AFNOR - 3M 01/06-09/97 - 3M *Petrifilm Enterobacteriaceae Count Plate. Enumeration of Enterobacteriaceae in all human food products, animal feed and production environmental samples.*

Contagem de Bolores e Leveduras- MA-140 R3 ISO 21527-1: 2008. *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds.*

Part 1: *Colony count technique in products with water activity greater than 0,95. / ISO 21527-2: 2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds. Part 2: Colony count technique in products with water activity less than 0,95. / ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.*

Part 1 - *General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. / ISO 7218-1:2013. Microbiology of food and animal feed stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.*

Pesquisa de Salmonella sp. em 25g- MA-145 R3 AOAC OMA - 2011.03 - *Salmonella in a Variety of Food* - VIDAS *Salmonella* (SLM) Easy *Salmonella* method. 21th ed. 2019.

4.2.4 Análises residual de antioxidantes:

As análises de concentração para residual de antioxidantes (BHA, BHT, Etoxiquina e Tocoferóis) foram realizadas no laboratório interno da empresa KEMIN na unidade de Valinhos – SP.

Empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência HPLC- FLD, equipada com módulo de separação, bomba quaternária e detector de fotodiodo; e Cromatografia gasosa GC-FID.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela Tabela 1, verifica-se que as médias de todas as variáveis (com exceção das variáveis AOX Total – residual de antioxidantes), apresentam pequenas flutuações entre os tratamentos, porém nada que faça um tratamento se destacar sobre os demais. Já no caso do AOX Total, as amostras de Naox (Antioxidante natural) possuem valores aparentemente mais elevados que nas amostras de Saox (Antioxidante sintético), em todos os níveis de dosagem.

Quando se observa as médias das variáveis por tempo na estufa, apresentadas na Tabela 2, verifica-se que em grande parte das variáveis as flutuações das médias no decorrer no tempo não aparentam mudanças relevantes. Em alguns casos como a Acidez, Umidade, Matéria Seca (MS) e AOX Total parece haver interferência temporal, onde a acidez e a matéria seca aparentam ter uma tendência crescente com o passar do tempo, na contramão da umidade, que parece diminuir com o passar dos meses. Já o AOX Total parecia vir em uma tendência decrescente, atingindo um pico no 4º mês e não apresentando mais uma tendência linear a partir de então.

Esses resultados mostram a relação da perda de umidade aumenta a concentração de matéria seca, esta oscilação pode ser um indicativo que a umidade de equilíbrio do produto tenha sido alcançada ou que tenha ocorrido reações químicas onde a água entra como reagente.

A água promove a reatividade enzimática de várias formas, destacando-se o aumento da mobilidade de enzimas, a estabilização da estrutura e configuração enzimáticas, além da função de reagente em reações de hidrólise. Quando a água participa de uma reação como reagente, o processo recebe o nome de reação de hidrólise, isso acontece porque a água promove a quebra da molécula que está reagindo com ela.

A redução na solubilidade dos gases com o aumento da temperatura para armazenamento, e o uso de embalagens com baixa barreira de vapor d'água, podem acelerar reações. Os resultados mostram que a embalagem apresenta uma barreira eficiente ao vapor d'água para a validade estipulada que é de 18 meses. Produtos desta categoria em geral apresentam validade de 12 meses em embalagens similares.

Tabela 1 – Médias das variáveis por amostra

Amostras	Fósforo	Cálcio	Proteína	Extrato.Etéreo	Fibra	Matéria Mineral	aW	Índice de Peróxido	Acidez	Umidade	MS	AOX Total
Controle	8.16	4.71	17.17	7.30	2.21	4.77	0.64	0.07	0.11	14.84	85.16	0.00
Naox 500g.ton	8.11	4.54	17.22	6.35	2.07	4.78	0.62	0.00	0.11	14.10	85.90	80.60
Naox 750g.ton	8.04	4.25	16.60	6.65	1.94	4.68	0.63	0.00	0.11	14.19	85.81	81.66
Naox 1000g.ton	7.64	4.11	16.71	6.51	1.96	4.54	0.64	0.00	0.12	14.08	85.92	110.51
Saox 500g.ton	8.05	4.32	16.96	6.64	1.86	4.93	0.63	0.00	0.11	14.25	85.75	38.37
Saox 750g.ton	7.91	4.39	16.61	6.50	1.97	4.78	0.63	0.00	0.12	14.36	85.64	54.64
Saox 1000g.ton	7.95	4.32	16.72	6.64	2.00	4.68	0.65	0.00	0.12	14.60	85.40	71.41

Fonte: Próprio autor

Tabela 2 – Médias das variáveis por tempo na estufa a 37°C

Tempo.Estufa	Fósforo	Cálcio	Proteína	Extrato.Etereo	Fibra	Matéria.Mineral	aW	Peróxido	Acidez	Umidade	MS	AOX.Total
0	8.61	2.87	17.00	7.72	1.71	4.72	0.66	0.00	0.05	15.76	84.24	84.41
1	7.74	2.49	16.83	7.04	2.01	4.67	0.64	0.00	0.05	16.11	83.89	77.81
2	7.84	3.90	16.86	7.50	2.04	4.70	0.63	0.00	0.13	14.91	85.09	24.66
3	8.19	5.52	17.01	6.32	2.04	4.81	0.61	0.00	0.13	13.87	86.13	23.58
4	7.39	5.79	16.65	5.96	2.11	4.69	0.63	0.00	0.14	13.76	86.24	104.95
5	8.27	8.04	16.75	5.92	2.05	4.72	0.62	0.00	0.14	14.23	85.77	52.56
6	7.83	2.03	16.89	6.14	2.05	4.84	0.65	0.07	0.16	11.77	88.23	69.23

Fonte: Próprio autor

Tabela 3 – Composição bromatológica dos alimentos com base na matéria mineral

Tratamentos	Teores (%)							
	MS	Umidade	PB	EE	FB	MM	P	Ca
Controle	85,16	14,84	17,17	7,30	2,21	4,77	8,16	4,71
Naox 500g/ton	85,90	14,10	17,22	6,35	2,07	4,78	8,11	4,54
Naox 750g/ton	85,81	14,19	16,60	6,65	1,94	4,68	8,04	4,25
Naox 1000g/ton	85,92	14,08	16,71	6,51	1,96	4,54	7,64	4,11
Saox 500g/ton	85,75	14,25	16,96	6,64	1,86	4,93	8,05	4,32
Saox 750g/ton	85,64	14,36	16,61	6,50	1,97	4,78	7,91	4,39
Saox 1000g/ton	85,40	14,60	16,72	6,64	2,00	4,68	7,95	4,32
CV (%)								

MS = matéria seca; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FB = fibra bruta; MM = matéria seca; P = fósforo;

Ca = cálcio

CV= coeficiente de variação

Fonte: Próprio autor

Tabela 4 – Composição físico-química dos alimentos aos xxx dias

Tratamentos	aW	Índice de Peróxido (meq/kg)	Acidez	AOX Total
Controle	0,64	0,07	0,11	0,00
Naox 500g/ton	0,62	0,00	0,11	80,60
Naox 750g/ton	0,63	0,00	0,11	81,66
Naox 1000g/ton	0,64	0,00	0,12	110,51
Saox 500g/ton	0,63	0,00	0,11	38,37
Saox 750g/ton	0,63	0,00	0,12	54,64
Saox 1000g/ton	0,65	0,00	0,12	71,41
CV (%)				

Fonte: Próprio autor

A atividade de água para os métodos de estufa e tempo real se manteve estável nos alimentos estudados até o presente período de estocagem. Todos os alimentos estão abaixo do valor determinado (Pela empresa produtora do alimento) para a atividade de água, sendo esse de 0,77. Isso mostra a boa estabilidade dos alimentos em relação a esse parâmetro, o teor de água livre é fundamental para determinação da *shelf life* de um produto, pois se apresenta com fator importante para controle de taxa de deterioração (FELLOWS, 2006).

Snacks semiúmido quando estocados em ambientes com baixa umidade relativa, tendem a perder a água para o ambiente, diminuindo sua umidade, o que

dificulta o crescimento de microrganismos, que representa um fator de segurança para o produto. Devido a perda de umidade observa-se uma pequena mudança de textura, (perda de amolecimento, o produto um pouco mais rígido), mas que não impacta diretamente no *shelf life*.

Como mostrado na Tabela 2 a acidez do produto apresentou alterações crescente, o que provavelmente é devido a um aumento na hidrólise de ácidos graxos no produto neste período.

A determinação da acidez fornecer um dado importante na avaliação do estado de conservação do produto. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons hidrogênio. A decomposição dos glicerídeos é acelerada por aquecimento e pela luz, sendo a rancidez quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres. Estes são frequentemente expressos em termos de índice de acidez.

O índice de peróxido é o produto da reação entre a gordura presente e o oxigênio, o que indica o estado de oxidação primária, e sua tendência para se tornar rançoso. O que provoca o ranço geralmente é a exposição prolongada ao ar, juntamente com a alta temperatura e ação direta da luz. Este resultado pode ser utilizado para avaliação das barreiras à luz e ao oxigênio da embalagem, ou seja, para este produto com a embalagem avaliada não seria necessário melhorias na embalagem para estas barreiras.

Os bifeinhos podem sofrer alterações de natureza química, ainda que não ocorra o crescimento fúngico durante o armazenamento. Nestes alimentos, devido ao alto teor de lipídeos, a rancificação oxidativa é a forma mais comum de deterioração química.

Muitas alterações deteriorantes importantes podem ocorrer decorrentes de reações dentro do alimento ou a partir de reações dos componentes dos alimentos com fatores externos, por exemplo, o oxigênio. O desenvolvimento de rancidez é um fator importante em alimentos que contêm gordura, e pode ocorrer através de diferentes mecanismos, como por exemplo, reações lipolíticas/hidrolíticas, reações oxidativas, e reações de reversão do sabor.

No estudo houve detecção de presença de peróxido apenas no último tempo apenas nas amostras controle analisadas (sem antioxidante), o que mostra a eficiência dos antioxidantes utilizados.

Os antioxidantes quantificados foram o BHT (Butilhidroxitolueno), BHA (Butilhidroxianisol) e Tocoferol, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016) e segundo o Jornal Oficial da União Europeia (OJEU, 2003), a mistura de etoxiquim com BHA e/ou BHT é autorizada desde que a concentração total da mistura não exceda 150 mg/kg de alimento final para o consumo dos animais.

Nota-se conforme tabela 2, que as amostras que receberam os antioxidantes sintético apresentaram dentro do limite, já em algumas amostras que receberam o antioxidante natural, excederam o valor de referência.

Outro ponto importante é sobre a presença de antioxidantes na amostra controle. Nas fichas técnicas das matérias primas não constava em nenhuma delas a inclusão de qualquer tipo de antioxidante. Como descartado a possibilidade de contaminação cruzada nas amostras controle, se realizou análises de quantificação em todos os lotes das matérias primas utilizadas, e foi constatado a presença de antioxidantes da farinha de vísceras de aves sendo detectável 70,26 mg/kg de BHT e 45,31 mg/kg de BHA. Sendo a inclusão desta matéria prima em 6,7% na base da matriz. O que justifica os resultados para peróxido e acidez apresentarem resultados menor do que o esperado.

De forma geral, o produto garantiu nutricionalmente todas suas propriedades durante o *shelf life* estudado, atendendo o que havia se estabelecido no rótulo do produto, em todas as amostras analisadas.

As análises iniciais microbiológicas estão dentro das especificações preconizadas pela empresa que são baseados nos limites estabelecidos pelas legislações vigentes. Observou-se que apenas na amostra controle e na amostra que recebeu 0,75% de dosagem do antioxidante natural, ambas do tempo 2, apresentou bolores e leveduras enquanto nas demais amostras não houve presença.

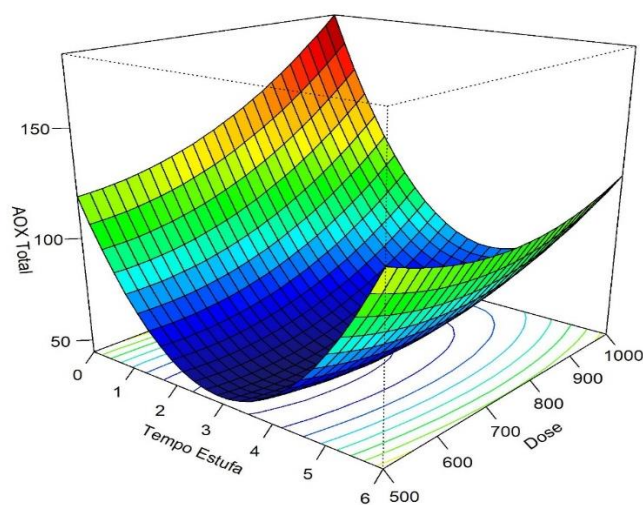
Todas as amostras passaram pelo mesmo processamento, utilizando os mesmos lotes de matérias primas, e estão com a atividade de água dentro da mesma especificação das demais amostras. Ou seja, a contaminação por bolores e leveduras foi pontual nestas amostras que pode ser justificada por alguma contaminação cruzada.

De acordo com Franco & Landgraf (2008), a atividade de água determina o limite mínimo para o crescimento microbiano, no caso de quaisquer microrganismos se considera o valor de 0,60 como o valor de A_w limitante, para crescimento de bolores

do grupo dos xerofílicos o valor mínimo é próximo de 0,65. A presença de bolores e leveduras pode-se tornar um perigo a saúde pública, por isso é de suma importância a implementação de boas práticas de higienização que a base para se garantir a segurança alimentar.

Superfície de resposta para a variável AOX Total nas amostras de Naox.

Figura 1 – Superfície de resposta para a variável AOX Total (Tempo na estufa x Dose) nas amostras de Naox



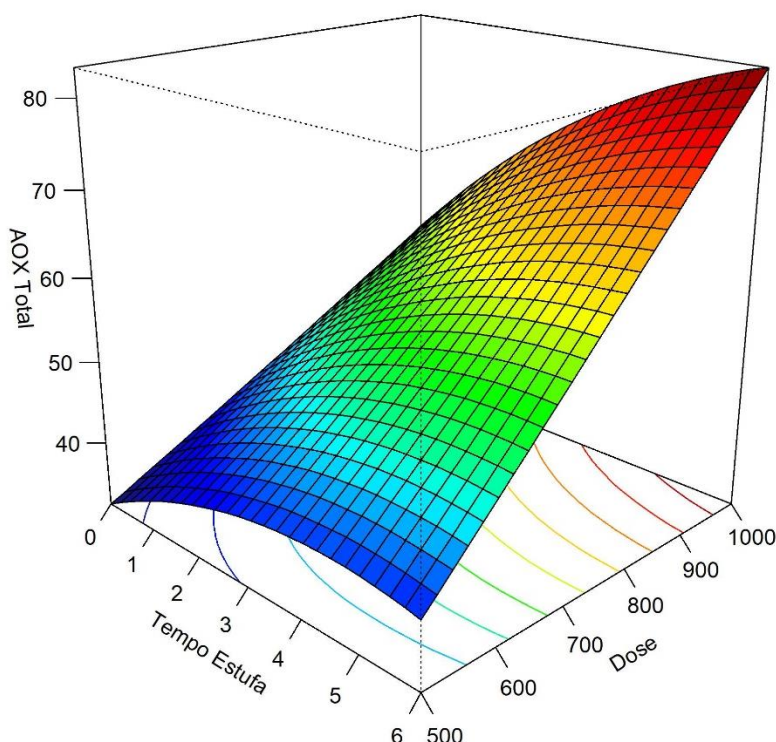
Fonte: Próprio autor

A superfície de resposta da Figura 1 apresenta que no caso do antioxidante do tipo Naox (natural), os maiores níveis de AOX Total (residual de antioxidante) ocorrem no tempo de aplicação (tempo 0 na estufa), com seu maior índice na dosagem 1000. Com o passar dos meses, os níveis de AOX Total decaem, atingindo os níveis mínimos em torno do 3º mês na estufa. Apesar do índice de peróxido das amostras ter se mantido baixo, estas perdas acentuadas de antioxidantes naturais indicam que as reações de oxidação no alimento estão ativas nas condições de estufa que os alimentos foram mantidos.

O modelo ajustado para o AOX Total considerando as amostras de Naox é escrito como:

$$AOX_{Total} = 168.65 + (-38.59)TempoEstufa + (-0.21)Dose + (-0.02)TempoEstufa \times Dose + (8.38)TempoEstufa^2 + (0)Dose^2$$

Figura 2 – Superfície de resposta para a variável AOX Total (Tempo na estufa x Dose) nas amostras de Saox



Fonte: Próprio autor

A superfície de resposta da Figura 2 apresenta que quanto menor a dosagem de antioxidante presente na amostra, menor o nível de AOX encontrada nela. Tal comportamento permanece no decorrer de todos os meses na estufa. Ao longo do tempo, as concentrações de antioxidantes sintéticos foram estáveis demonstrando maior estabilidade destes compostos, e estas concentrações foram proporcionais a dosagem aplicada.

O modelo ajustado para o AOX Total considerando as amostras de Saox é escrito como:

$$AOX_{Total} = 11.34 + (0.67)TempoEstufa + (0.04)Dose + (0.01)TempoEstufa \times Dose + (-0.46)TempoEstufa^2 + (0)Dose^2$$

Durante os 10 meses de estudo em tempo real os resultados estão de acordo com método acelerado.

Considerando que 1 dia em estufa a 37°C equivale a 3 dias em temperatura ambiente, no final do estudo 180 dias equivalem a 540 dias, ou aproximadamente 1 ano e 6 meses. Cada tempo do estudo foi avaliado em um pacote diferente de um mesmo lote, embalagem original do produto.

As amostras analisadas que foram tratadas com Pet-Ox Plus Dry (Antioxidante sintético BHA e BHT) em diferentes quantidades, apresentaram estabilidade oxidativa satisfatória até o final do estudo, considerando os parâmetros avaliados. Já as amostras que foram tratadas com variações de dosagem de Verdilox IP GT Dry (Antioxidante natural Tocoferóis) pode-se observar uma queda mais acentuada a partir de 150 dias em estufa a 37°C (1 ano e 3 meses).

Ou seja, o antioxidante sintético foi o que mostrou o melhor desempenho.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, as análises bromatológicas, umidade e atividade de água apresentaram poucas alterações ao longo do *shelf-life*, indicando estabilidade do produto que podem estar relacionados à qualidade dos ingredientes, embalagem e condições de processamento.

Entre os dois modelos matemáticos aplicados, o SAOX apresentou um melhor ajuste. Com isso conclui-se que SAOX é o mais estável para aplicação no alimento extrusado semiúmido usado neste estudo. Apesar das diferenças na estabilidade dos antioxidantes, todos os produtos se mostraram dentro de padrões aceitáveis ao longo do *shelf-life*, independentemente de serem preservados com antioxidantes naturais ou sintéticos.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO - ABINPET. **Mercado Pet Brasil**: 2020. São Paulo: ABINPET, 2020. Disponível em: http://abinpet.org.br/wp-content/uploads/2020/06/abinpet_folder_2020_draft3.pdf. Acesso em: 30 mar. 2023.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO - ABINPET. **Mercado Pet Brasil**: 2023. São Paulo: ABINPET, 2023. Disponível em: https://abinpet.org.br/wpcontent/uploads/2023/03/abinpet_folder_dados_mercado_2023_draft1_incompleto_web.pdf. Acesso em: 30 mar. 2023.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. Informações gerais setor Pet. São Paulo: ABINPET, 2018. Disponível em: https://abinpet.org.br/infos_gerais/. Acesso em: 27 jan. 2022.
- ADEGOKE, G. O., KUMAR, M. V., KRISHNA, A. G. G. et al. Antioxidants and lipid oxidation in foods: a critical appraisal. **J. Food Science. Tech.**, v. 35, n. 4, p. 283-298, 1998.
- FATORES que influenciam o Shelf Life nos alimentos. **Aditivos e Ingredientes**, São Paulo, v. 115, p.21-27, 2015.
- AMENSOUR, M.; SENDRA, E.; ABRINI, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. Antioxidant activity and total phenolic compounds of myrtle extracts. **CyTA - Journal of Food**, v.8, p. 95-101, 2010. DOI: 10.1080/19476330903161335.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA (Brasil). **Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999**. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Brasília, DF.: Diário Oficial da União, 1999.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 6. ed. Viçosa, MG: UFV, 2015. 668 p.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: Imprensa Universitária; Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5 ed. Viçosa, MG: UFV; 2011.
- AZEREDO, H. M. C.; FARIA, J. A. F. **Fundamentos de cinética de degradação e estimativa de shelf life**. Alimentos, p. 103, 2004.
- AZEREDO, H.M.C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 2. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2012.

BAILEY, A. E.; **Bailey's industrial oil and fat products**. 5th ed. New York: John Wiley, 1996. v. 3.

BARÃO, M. Z. **Embalagens para produtos alimentícios**. Curitiba: Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR, 2011. (Dossiê Técnico).

BARRIUSO, B.; ASTIASARÁN, I., D. ANSORENA. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 236, p. 1-15. 2013.

BELLAVER, C.; ZANOTTO, D. Parâmetros de Qualidade em Gorduras e Subprodutos Protéicos de Origem Animal. In: **Conferência APINCO**, 2004, Santos, SP, p. 21. 2004.

BLIGH, E.G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol**, Bethesda, v. 37, p.911-917, 1959.

BOEKEL, M. A. J. S. Kinetic modeling of food quality: a critical review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S.l.], v. 7, p.1 44-158, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 30, de 05 de agosto de 2009**. Estabelece critérios e procedimentos para o registro de produtos, para rotulagem e propaganda e para isenção da obrigatoriedade de registro de produtos destinados à alimentação de animais de companhia. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 15 de 09 de maio de 2005**. Regulamento técnico para testes de estabilidade de produto farmacêutico de uso veterinário. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62 de 31/06/2016**. Estabelece limites para utilização de antioxidantes sintéticos. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016.

BUSSAB, Wilton de O.; MORETTIN, Pedro A. **Estatística básica**. In: Estatística básica. São Paulo: Saraiva, 2010. p. xvi-540.

BUTOLO, J. E. 2010. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. 2.ed. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal-CBNA, 2010.

CALLIGARES, S.; MANZOCCO, L., ANESE, M., NICOLI, M. C. Shelf-life assessment of food undergoing oxidation – a review. **Food Science and Nutrition**, v. 56, p. 1903-1912, 2015.

CALLIGARIS, S., PIEVE, S. D., KRAVING, G., MANZOCCO, L., NICOLLI, C. M. 2008. Shelf-life prediction of bread sticks using oxidation indices: a validation study.

Journal of Food Science, v. 73, p. 51-56.

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

CHANADANG, S., KOPPEL, K., ALDRICH, G. The impact of rendered protein meal oxidation level on shelf-life, sensory characteristics and acceptability in extruded pet food. **Animals**. v. 6, p. 44-61, 2016.

COHEN, J. **Statistical power analysis for the behavioural sciences**. New York: Academic Press, 1969.

CONEGLIAN, Sabrina Marcantonio et al. Utilização de antioxidantes nas rações. **Pubvet**, v. 5, p. Art. 1019-1026, 2011.

CORRADINI, M. G.; PELEG, M. Shelf-life estimation from accelerated storage data. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.1 8, p. 37-47, 2007.

DAVY, H. Os antioxidantes. **Food Ingredients Bras**. v. 6, p. 16–31, 2009.

DIAS, J. A Importância da Segurança Alimentar. **Jornal Hipersuper**, junho de 2007.

DITCHFIELD, C. **Estudo dos métodos para a medida de atividade de água**. São Paulo, 2000.

DOBARGANES, M. C., VELASCO, J. Analysis of lipids hydroperoxides. **Eur. J. Lipid. Sci. Technol.**, v. 104, p. 420-428, 2002.

DROZDOWSKI, B., SZUKALSKA, E. A rapid instrumental method for the evaluation of the stability of fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 64, p. 1008-1011, 1987.

ECONOMOU, K.D., OREOPOULOU, V., THOMOPOULOS, C.D. Antioxidant activity of some plant extracts of the family labiatae. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 68, n. 2, p.109-113, 1991.

FARIA, J.A.F; CAMARGO, L.R; CASTRO W.F. **Estimativa da Shelf life**. Apresentação Capítulo 9. - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008. Disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/374995/>. Acesso em 28.jan.2023.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

FERRARI, C.K.B. Oxidação Lipídica em Alimentos e Sistemas Biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 11, p.3-14, jun. 1998.

FOOD Ingredientes Brasil. **FIB**, São Paulo, v. 18, 2011.

FISCHER, G.; BERMUDEZ, V.L.; SIQUEIRA, E.B.; DEL PINO, F.A.B.; ANCIUTI, M.A.; MAIER, J.C.; RUTZ, F. Peroxidação em amostras de milho, protegidas ou não por etoxiquim. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, p.227-232, 2005.

FRANÇA, J; SAWD, F M. O. B.; SAWD, C. E. P.; SILVA, R. C.; REIS, J. S. Avaliação de ingredientes convencionais e alternativos em rações de cães e gatos. **Rev. Brasileira Zootecnia**, v.40, p. 222-231, 2011.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

GRANT ABT, COLIN BOREHAM, GARETH DAVISON, ROBIN JACKSON, ALAN NEVILL, ERIC WALLACE & MARK WILLIAMS. Power, precision, and sample size estimation in sport and exercise science research. **Journal of Sports Sciences**, v. 38, n. 17, p. 1933-1935, 2020. DOI: 10.1080/02640414.2020.1776002.

GRIZOTTO R.K; BERBARI S.A.G; MOURA S.C. S.R; CLAUS M.L. Estudo da shelf life de fruta estruturada e desidratada obtida de polpa concentrada de mamão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, 2006.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LOLINGER, J., ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HILL, S.E. A comparison of modern instruments for the analysis of the oxidation stability of fats, oils and foods. **Inform**, v. 5, 104-109. 1994.

HILTON, J. W. **Antioxidants**: function, types and necessity of inclusion in pet foods. **Canadian Veterinary Journal**, v. 30, p. 682-684, 1989.

HOFFMANN, Fernando Leite. Fatores limitantes à proliferação de microrganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, São José do Rio Preto, v. 9, p.23-30, ago. 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: v. 1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p.245-256.

ROCHA JUNIOR, Carlos Magno da. **Aditivos Tecnológicos em Processo e na Digestibilidade de Alimentos Secos Extrusados para Cães**. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, 2019.

KÄHKÖNEN, M.P., HOPIA, A.I., VUORELA, H.J., RAUHA, J.-P., PIHLAJA, K.,

KUJALA, T.S., HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 47, p. 3954-3962, 1999.

KRABBE, E.L.; SANDRI, E. Calidad de las materias primas en la elaboración de raciones: bases para el éxito, *In*: SEMINARIO INTERNACIONAL AVÍCOLA, 5., Cusco. **Anais [...]** Cusco: Invetsa, 2012.

LABUZA, T. P. **Shelf-life dating of foods**. Westport: Food & Nutrition Press, 1982. 500 p.

LAKENS, DANIËL. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and anovas. **Frontiers in psychology**, v. 4, p. 863, 2013.

MADHAVI, D. L.; Salunkhe, D. K. **Antioxidants**. Marcel Dekker: New York, 1995, p. 89

MANUAL PET FOOD BRASIL 10^a edição. **Referência em Qualidade e Segurança de Alimentos**. Novembro, 2019.

MARTÍNEZ- MESA, JEOVANY et al. Sample size: how many participants do I need in my research? **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, p. 609-615, 2014.

MARTINS, G.A.S. **Determinação da shelf life por testes acelerados de doce em massa de banana c.v. prata**. Lavras: UFLA, 2009.

MEDEIROS, A.C.S. Preparo e uso de soluções salinas saturadas para a caracterização fisiológica de sementes florestais. **Circular técnica**, Colombo, 125, dez. 2006. (Embrapa Florestas).

MENDES, Wandrea de Souza. Uso de antioxidantes em pet food. **Nutrição: Pet Horse**, São Paulo, ed. 23, p.11-14, 2011.

MONTGOMERY, Douglas C. Experimental design for product and process design and development. **Journal of the Royal Statistical Society: Series D (The Statistician)**, v. 48, n. 2, p. 159-177, 1999.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. 2nd ed. New York: John Wiley Professional, 1995. (Wiley Series in Probability and Statistics).

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington, D.C: National Academy Press, 2006.

OJEU. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. **Official Journal of European Union**, Brussels, Belgium, 2003.

O' KEEFE, S. F., PIKE, O. A. NIELSEN, S. S. 2010. Fat Analysis. **Food Analysis**, v.

14, p. 239- 262.

PAGANO, Marcello; GAUVREAU, Kimberlee. **Princípios de bioestatística**. SÃO PAULO: Cengage Learning, 2011. 506 p.

PINTO, J.V. **Elaboração de manual prático para determinação de shelf life de produtos alimentícios**. Porto Alegre: [S. n.], 2015.

RAMALHO, Valéria Cristina; JORGE, Neuza. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química nova**, [S. l.], p. 755-760, 2006.

R CORE TEAM. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R **Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 30 mar. 2023.

RIBEIRO, Priscila Martins et al. **Oxidação Lipídica no processo de extrusão em Pet food**. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá.

RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., BOLWELL, P.G., BRAMLEY, P.M., PRIDHAM, J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Res.**, Amsterdam, v.22, n.4, p.375- 383, 1995.

SAGUY, I.; KAREL, M. Modeling of quality deterioration during food processing and storage. **Food Technology**, Chicago, v. 34, n. 2, p. 78-85, 1980.

SHAHIDI, F., WANASUNDARA, U. N., AKOH, C. C., MIN, D. B. 2002. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. Marcel Dekker. 465-487.

SILVA, A. A., PENA, S. A.; ASSIS, F. G., MONTEFOGLIA, N., CASTILHA, L. D., NASCIMENTO, S. T., VASCONCELLOS, R. S. Estabilidade oxidativa e qualidade de bifeinhos para cães formulados com antioxidante natural. **PUBVET**, v. 11, p. 30-137, 2017.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. 2002. **Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002.

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

SILVA, Mayara Uana da. **Avaliação da estabilidade oxidativa e isotermas de adsorção em Pet food**. 2017 Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, 2018.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL - SINDIRAÇÕES. **Compêndio brasileiro de alimentação animal**: guia de métodos analíticos. Sindirações – metodologia, n. 44, p. 163-166, 2009.

TAOUKIS, P. S.; LABUZA, T. P.; SAGUY, I. S. Kinetics of food deterioration and shelf-life prediction. *In*: VALENTAS, K. J.; ROTSTEIN, E.; SINGH, R. P. (Ed.).

Hanbook of food engeneering practice. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 361-403.

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

VASCONCELLOS, R.S., 2016. Antioxidantes Naturais e Sintéticos: Evidências Científicas de Segurança e Riscos. *In*: CONGRESSO CBNA PET, 145., 2016, CBNA PET.

VITALI, A. A; NETO.R.O.T. **Reações de transformações e shelf life de alimentos processados.** Manual técnico nº6 .2. ed. Campinas: ITAL /PADCT /MCT /IBICT /FUNDEPAG, 1996.

VITALI, A. A., QUAST, D. G. **Shelf life de alimentos.** *In*: Reações de transformação e vida-de-prateleira de alimentos processados. 3 ed. Campinas: ITAL. Manual Técnico, 2004. p. 49-57.

XAVIER, H. P. F. **Extrato de resíduo de goiaba como aditivo antioxidante na ração de codornas** (Coturnix japônica). Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Goiás, 2017.

XIONG, Y. L. Protein oxidation and implications for muscle food quality. *In*: DECKER, E., C., F. & Lopez-Bote, C. J. (eds.) **Antioxidants in muscle foods: nutritional strategies to improve quality.** Chichester: Wiley, 2000.

ZICKER C. S., WEDEKIND J. K. **Antioxidants.** 5. Ed. Mark Morris Institute: Small Animal Clinical Nutrition. 150-155p. 2010.