



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CRISTIANE CANAN

**PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO DO FARELO DE ARROZ:
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E APLICAÇÃO EM
PRODUTOS CÁRNEOS**

Londrina
2010

CRISTIANE CANAN

**PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO DO FARELO DE ARROZ:
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E APLICAÇÃO EM
PRODUTOS CÁRNEOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação,
em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual
de Londrina como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Elza Iouko Ida

Londrina
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C213p Canan, Cristiane.

Purificação do ácido fítico do farelo de arroz : propriedades antioxidantes e aplicação em produtos cárneos / Cristiane Canan. – Londrina, 2010.
xiii, 148 f. : il.

Orientador: Elza Iouko Ida.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos – Composição – Teses. 2. Ácido fítico – Teses. 3. Farelo de arroz – Produtos – Indústria – Teses. 4. Antioxidantes – Teses. 5. Embutidos – Teses. I. Ida, Elza Iouko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641:577.1

CRISTIANE CANAN

**PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO DO FARELO DE ARROZ:
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E APLICAÇÃO EM PRODUTOS
CÁRNEOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação,
em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual
de Londrina como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elza Iouko Ida
UEL/Londrina-PR

Prof. Dr. Jorge Mancini Filho
USP/São Paulo-SP

Prof. Dr. Nilson Evelázio de Souza
UEM/Maringá-PR

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa
UFRG/Rio Grande-RS

Profa. Dra. Sandra Helena Prudencio
UEL/Londrina-PR

Londrina, 01 de julho de 2010.

Dedicatória

Aos meus pais, Cristina e Aroldo (in memoriam).

À minha irmã Clair, às minhas sobrinhas Camila e Renata e meu cunhado

Romeu.

A vocês dedico.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elza Iouko Ida pela sábia e dedicada orientação, profissionalismo e por tudo o que me ensinou ao longo dos caminhos da ciência e da vida.

Ao Prof. Dr. Massami Shimokomaki pela inestimável colaboração e sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Às Profas. Dra. Rubia Casagrande, Dra. Cleonice M. P. Sarmiento e Dra. Adriana Lourenço Soares pelo auxílio e sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

À amiga Fernanda Delaroza pela ajuda e companheirismo em todas as atividades desenvolvidas neste trabalho.

À UTFPR, Campus Medianeira pelo apoio recebido.

Ao Instituto Riograndense do Arroz (IRGA), na pessoa de Carlos Alberto Alves Fagundes pelo apoio e amostras cedidas de farelo de arroz.

Ao Abatedouro de Aves Lar, localizado na cidade de Matelândia, Paraná, pelas amostras cedidas de Carne Mecanicamente Separada (CMS).

Ao Frigorífico Frimesa, localizado na cidade de Medianeira, Paraná, pela doação da matéria-prima e ingredientes utilizados para elaboração do embutido cárneo.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos desta Instituição pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho.

Aos docentes do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos desta Instituição pelos ensinamentos e pela atenção dispensada.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos desta Instituição, em especial a Sandra Rezende, Elza Youssef Youssef e Berenice Figueiredo pelo apoio técnico e administrativo.

Aos estagiários Felipe Tsuruta Lisboa Cruz, Mauro Pappi e Pedro Paulo Paccola pela ajuda prestada durante os trabalhos práticos.

A todos os colegas deste Programa de Pós-graduação em especial às amigas Cassiana Kissel, Cristina Tostes Filgueiras, Michele Rosset, Adriana Droval e Gislaine Silveira Simões pelos momentos compartilhados e pelo incentivo nos dias difíceis.

A Deus pela graça da vida e por tudo o que nela tem realizado.

"O teu espírito é como qualquer teia de aranha. Após de cada linha de chegada, há uma de partida. Após de cada conquista, vem um novo desafio.

Enquanto estiver vivo, sintá-se vivo [...]

Continue, quando todos esperam que desista.

Não deixe que enferruje o ferro que existe em você.

Faça com que, em vez de pena, tenham respeito por você.

Quando não conseguir correr através dos anos, trote.

Quando não conseguir trotar, caminhe.

Quando não conseguir caminhar, use uma bengala.

Mas nunca se detenha."

Madre Teresa de Calcutá

CANAN, Cristiane. **Purificação do ácido fítico do farelo de arroz: propriedades antioxidantes e aplicação em produtos cárneos.** 2010. 144f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica de extração e purificação de ácido fítico (AF) do farelo de arroz, avaliar as propriedades antioxidantes e aplicar em carne mecanicamente separada (CMS) de frango e em produto cárneo tipo mortadela. Foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^4 com três pontos centrais para avaliar a extração do AF, e o efeito das variáveis concentração de farelo de arroz e HCl, tempo e temperatura foram investigados. Durante a purificação, diferentes valores de pH foram testados com adição de Na_2CO_3 $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ou NaOH $4,0 \text{ mol.L}^{-1}$. A capacidade antioxidante do AF purificado foi avaliada e posteriormente, foi aplicado em CMS de frango e também em mortadela em associação com eritorbato de sódio. Concentrações de $5,0$ e $10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de AF purificado ou AF padrão foram aplicadas em CMS estocada a -18°C por 120 dias e avaliada a oxidação lipídica e aroma de requentado (WOF) em intervalos de 15 dias. Um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi utilizado para verificar a influência do AF purificado e eritorbato de sódio em mortadela. A temperatura, tempo e concentração de HCl tiveram influência significativa ($p < 0,05$) na técnica de extração, enquanto que a concentração de farelo de arroz não foi significativa. O AF purificado apresentou capacidade quelante do ferro que foi dependente da sua concentração e tempo de contato para formação do complexo Fe^{2+} -ácido fítico através do ensaio da batofenantrolina. Além disso, foi observada inibição da formação do radical hidroxil pelo AF purificado através do ensaio da deoxirribose. O AF purificado em CMS reduziu a oxidação lipídica e WOF e em associação com o eritorbato de sódio, foi observado um efeito sinérgico na inibição da oxidação lipídica em mortadela, embora o AF tenha uma forte capacidade antioxidante em relação ao eritorbato de sódio. Finalmente, os resultados demonstraram o desenvolvimento de uma nova e eficiente técnica de extração e purificação de AF com alta pureza, rendimento e com forte capacidade antioxidante.

Palavras-chave: Ácido fítico. Farelo de arroz. Eritorbato de sódio. Antioxidante. Peroxidação lipídica. Embutidos cárneos. Subprodutos. Carne mecanicamente separada.

CANAN, Cristiane. **Purification of phytic acid from rice bran: antioxidant properties and application in meat products.** 2010. 144p. Thesis (Doctorate in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2010.

ABSTRACT

The objective of this work was to develop a technique of extraction and purification of rice bran phytic acid (PA), to evaluate its antioxidant properties and to apply mechanically deboned poultry meat (MDPM) and in meat derived product as mortadella. A complete 2^4 factorial design with three central point for PA extraction was used, and the variables effects of rice bran and HCl solution concentrations, time and temperature were investigated. During purification, different pH values were tested with addition of either $1.5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ or $4.0 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaOH}$. The antioxidant capacity of purified PA was evaluated and applied in MDPM and also in mortadella in association with sodium erythorbate. Purified PA and standard PA were applied in MDPM stored at -18°C for 120 days at 5mM and 10mM/kg concentrations and lipid oxidation and warmed-over flavor (WOF) was monitored at intervals of 15 days. A central composite rotational design (CCRD) was used to verify the influence of purified PA and sodium erythorbate in mortadella. The temperature, time and HCl solution concentration had a significant influence ($p < 0.05$) in the PA extraction technique while the concentration of rice bran did not. Purified PA presented chelating capacity for ferrous ion which was dependent on its concentration and contact time conditions for the formation of Fe^{2+} -phytic acid as observed through bathophenanthroline reaction. Furthermore, it was observed the inhibition of hydroxyl radical formation by purified PA through deoxyribose reaction. Purified PA in MDPM reduced the lipid oxidation and WOF and in association to sodium erythorbate, a synergistic effect by inhibiting lipid oxidation was observed in mortadella although PA had a stronger antioxidant properties in relation to erythorbate. Finally, the results showed a new and efficient technique for PA extraction and purification was developed with a high purity and yielding with a robust antioxidant capacity.

Keywords: Phytic acid. Rice bran. Sodium erythorbate. Antioxidant. Lipid peroxidation. Mortadella. By-products. Mechanically deboned meat.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matriz dos ensaios do delineamento fatorial 2 com as variáveis independentes	34
Tabela 2 – Variáveis e níveis de variação	35
Tabela 3 – Matérias-primas e aditivos para elaboração de mortadela de frango	46
Tabela 4 – Matriz dos ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR).....	46
Tabela 5 – Variáveis e níveis de variação	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura do ácido fítico em solução (COSTELLO *et al.*, 1976)..... 16
- Figura 2** – Processo de extração e purificação do ácido fítico do farelo de arroz..... 37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 CARACTERÍSTICAS DO ÁCIDO FÍTICO E SUAS FONTES	16
3.2 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DE ÁCIDO FÍTICO	17
3.3 BENEFÍCIOS E APLICAÇÕES DO ÁCIDO FÍTICO.....	19
3.4 OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CARNES.....	23
3.5 CARNE MECANICAMENTE SEPARADA DE AVES	26
3.6 EMBUTIDOS CÁRNEOS	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 MATERIAL	31
4.1.1 Matéria-prima	31
4.1.2 Reagentes.....	31
4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS	31
4.2.1 Preparo de Amostra de Farelo de Arroz para Extração de Ácido Fítico	31
4.2.2 Determinação do Teor de Ácido Fítico	32
4.2.3 Determinação de Umidade	32
4.2.4 Planejamento Experimental para Extração de Ácido Fítico do Farelo de Arroz.....	32
4.2.5 Técnica de Purificação de Ácido Fítico do Farelo de Arroz	35
4.2.5.1 Efeito do pH do sobrenadante S ₁ para precipitação do ácido fítico	35
4.2.5.2 Efeito do pH do sobrenadante S ₃ para precipitação do ácido fítico	36
4.2.5.3 Rendimento do ácido fítico purificado do farelo de arroz.....	36
4.2.6 Avaliação do Processo de Purificação de Ácido Fítico Obtido do Farelo de Arroz.....	38
4.2.6.1 Teor de fósforo fítico, fósforo inorgânico e fósforo total.....	38
4.2.6.2 Teor de proteínas solúveis, nitrogênio e proteínas totais.....	38
4.2.6.3 Teor de minerais	38
4.2.6.4 Solubilidade	39

4.2.7 Avaliação da Capacidade Antioxidante do Ácido Fítico Purificado do Farelo de Arroz	39
4.2.7.1 Capacidade redutora do íon ferro pelo ácido fítico utilizando a 2,4,6-tripiridil-s-triazina pelo método de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	39
4.2.7.2 Capacidade queladora do íon ferro pelo ácido fítico utilizando o método da batofenatrolina (BPS)	40
4.2.7.3 Capacidade inibitória do radical hidroxil pelo ácido fítico utilizando o método de deoxirribose.....	41
4.2.7.4 Precisão dos métodos analíticos	42
4.2.8 Avaliação do Potencial Antioxidante do Ácido Fítico Purificado do Farelo de Arroz em CMS de Aves e Embutido Carne	42
4.2.8.1 Ácido fítico purificado como antioxidante em CMS de frango	42
4.2.8.2 Medida de oxidação lipídica.....	43
4.2.8.3 Determinação do aroma de requeijado	43
4.2.8.4 Avaliação do ácido fítico e eritorbato de sódio na estabilidade oxidativa de mortadela	44
4.2.8.4.1 Preparo da Mortadela.....	44
4.2.8.4.2 Delineamento Experimental	44
REFERÊNCIAS	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1: EXTRACTION AND PURIFICATION TECHNIQUES FOR RICE BRAN PHYTIC ACID. SUBMETIDO AO <i>JOURNAL OF FOOD COMPOSITION AND ANALYSIS</i>	61
5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2: CAPACIDADE ANTIOXIDANTES DO ÁCIDO FÍTICO PURIFICADO DE FARELO DE ARROZ. SUBMETIDO À QUÍMICA NOVA.....	93
5.3 ARTIGO CIENTÍFICO 3: ÁCIDO FÍTICO DO FARELO DE ARROZ COMO ANTIOXIDANTE EM CARNE MECANICAMENTE SEPARADA (CMS) E MORTADELA DE FRANGO. SERÁ SUBMETIDO A <i>FOOD CHEMISTRY</i>	113
6 CONCLUSÃO	142
ANEXO	143

1 INTRODUÇÃO

O ácido fítico ou mio-inositol hexafosfato (IP6) tem forte poder quelante de íons metálicos multivalentes, especialmente o ferro, zinco e cálcio (HURRELL, 2004), devido sua estrutura química única com seis grupamentos fosfato que podem formar complexos fortes e insolúveis com cátions di e tri valentes (VOHRA *et al.*, 1965; OBERLEAS, 1973). Por esta característica, durante muitos anos foi considerado como um composto antinutricional devido à capacidade de reduzir a biodisponibilidade de alguns minerais importantes na dieta.

Entretanto, nos últimos anos, a capacidade antioxidante do ácido fítico principalmente de produtos cárneos tem sido descrita por vários pesquisadores (SOARES *et al.*, 2004; STODOLAK *et al.*, 2007; HARBACH *et al.*, 2007; FILGUEIRAS, 2009) por formar quelato com o íon Fe^{2+} tornando-o cataliticamente inativo e inibir a formação de radicais hidroxil ($^{\bullet}HO$). Destacam-se também os seus efeitos benéficos à saúde humana, como no tratamento da diabetes (LEE *et al.*, 2006), cálculo renal (SAW *et al.*, 2007) doença de Parkinson (XU *et al.*, 2008) e câncer (FOX; EBERL, 2002; SHAMSUDDIN, 2002; VUCENIK; SHAMSUDDIN, 2006; NORAZALINA *et al.*, 2009).

O ácido fítico no arroz está distribuído em seus diferentes componentes, com 80 % de fósforo fítico concentrado no pericarpo e aleurona, 7,6 % no germe e 1,2 % no endosperma (O'DELL *et al.*, 1972). O farelo de arroz constituído de pericarpo, aleurona e germe apresenta elevado teor de ácido fítico que varia de 5,94 a 6,09 % (KASIM; EDWARDS JR., 1998). O farelo de arroz é considerado um subproduto da indústria de arroz, produzido em larga escala e utilizado somente para extração de óleo e o resíduo utilizado como ingrediente para elaboração de ração (SILVA *et al.*, 2006).

Processos de obtenção e purificação de ácido fítico ou fitatos a partir do farelo de arroz foram pouco explorados. Entretanto, há descrição na literatura de vários métodos de quantificação do ácido fítico nos quais foram utilizadas diferentes condições de extração em matérias-primas de origem vegetal. O nosso grupo de pesquisa tem investigado o ácido fítico como antioxidante e aplicado em carnes e observado que inibiu significativamente o desenvolvimento de aroma de requeijado ou WOF (warmed-over flavor) de carnes de frango (SHIMOKOMAKI *et al.*, 1999). Além disso, preveniu a oxidação lipídica de maneira sinérgica em carnes de frangos que receberam vitamina E em suas dietas (SOARES *et al.*, 2004). Quando administrado na dieta de suínos preveniu a rancidez da carne, sem prejudicar a

saúde dos animais (HARBACH *et al.*, 2007). O potencial antioxidante do ácido fítico obtido do germe de milho foi confirmado pelos ensaios da deoxirribose e batofenantrolina por Filgueiras *et al.* (2009).

A indústria cárnea necessita melhorar a estabilidade de seus produtos e o estudo de novos aditivos pode contribuir para aumentar a validade e qualidade de carnes e produtos cárneos. No Brasil, a obtenção e uso do ácido fítico como aditivo alimentar ou como antioxidante tem sido explorado somente pelo nosso grupo de pesquisa e ainda não foi totalmente estabelecida uma técnica para sua extração e purificação, bem como a aplicação direta em alimentos. Portanto, neste trabalho o ácido fítico foi extraído e purificado do farelo de arroz e avaliada a sua capacidade antioxidante e aplicação em carne mecanicamente separada de frango e em um embutido cárneo cozido tipo mortadela de frango.

2 OBJETIVOS

Desenvolver um processo analítico para extração e purificação de ácido fítico do farelo de arroz.

Avaliar a capacidade antioxidante do ácido fítico purificado do farelo de arroz por meio da determinação do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), Ensaio da Batofenantrolina (BPS) e Deoxirribose e os efeitos antioxidantes em carne mecanicamente separada (CMS) de frango e em combinação com eritorbato de sódio em mortadela de frango.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARACTERÍSTICAS DO ÁCIDO FÍTICO E SUAS FONTES

O ácido fítico é comumente denominado de ácido hexafosfórico mio-inositol ou 1,2,3,4,5,6 hexafosfato de hidrogênio mio-inositol (IUPAC - IUB, 1968). É um composto inerte, estável e na forma sólida pode ser estocado por muitos anos e em solução aquosa neutra, ou solução alcalina a 5°C pode ser conservado por vários meses sem se decompor (COSGROVE, 1966). Johnson e Tate (1969) e Blank *et al.* (1971) investigaram a estrutura do ácido fítico por meio de análises cristalográficas de raios X e destacaram a sua estrutura como éster hexaortofosfato de mio-inositol com grupos fosfatos C1, 3, 4, 5 e 6 na posição axial e C2 na posição equatorial. Os seis grupamentos fosfato do ácido fítico podem formar complexos fortes e insolúveis com cátions, tais como Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} e Ca^{2+} (OBERLEAS, 1973), não apenas com uma ou duas moléculas de fosfato, mas também entre duas moléculas de ácido fítico (CHAMPAGNE; PHILLIPPY, 1989) ou também formar complexos ternários proteína-metal-fitato (GRAF, 1983) devido a suas cargas negativas. Costello *et al.* (1976) empregaram ressonância nuclear magnética e propuseram a conformação de cadeira do mio-inositol hexafosforilado em soluções (FIGURA 1).

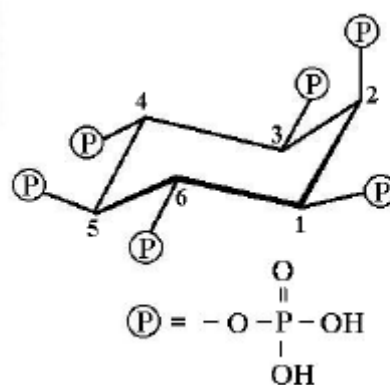


Figura 1 – Estrutura do ácido fítico em solução (COSTELLO *et al.*, 1976)

O ácido fítico está presente nos vegetais (CHERYAN, 1980; HARLAND; OBERLEAS, 1987) e principalmente em grãos e sementes, como aveia que contém 0,91 %; cevada 1,03 % (LOLAS *et al.*, 1976); trigo 0,67 %; milho 0,93 % (KASIM; EDWARDS,

1998); soja 1,50 % (REDDY, 2002) e arroz com 0,83 % (LIU *et al.*, 2005). No arroz, o endosperma amilífero dos grãos é praticamente destituído de fitato (REDDY, 2002), estando distribuído nos demais componentes, ou seja, 80 % do fósforo fítico está concentrado no pericarpo e aleurona, 7,6 % no germe e 1,2 % no endosperma (O'DELL *et al.*, 1972). O farelo de arroz é constituído de pericarpo, aleurona e o germe que apresenta elevado teor de ácido fítico, próximo de 6,02 % (KASIM; EDWARDS Jr, 1998).

Os fitatos de sementes monocotiledôneas estão associados a componentes específicos ou partes da semente (REDDY, 2002), apresentam-se como inclusões nos corpos protéicos na forma de pequenos agregados densos denominados globóides (PRATTLEY; STANLEY, 1983). Os fitatos no arroz, trigo e milho ocorrem principalmente como sais de potássio e magnésio, no gergelim como sais de magnésio (O'DELL *et al.*, 1972; O'DELL; DeBOLAND, 1976) e na soja como sais de cálcio-potássio-magnésio (PRATTLEY; STANLEY, 1983).

Estudos *in vitro* indicam que o mio-inositol hexafosfato (IP6) e seus derivados, o IP5, IP4 e IP3, ligam-se a íons metálicos em pH 6,0 similar ao pH do duodeno. A capacidade da ligação do inositol fosfato aos íons metálicos é dependente do número de grupos fosfatos desprotonados da molécula (PERSSON *et al.*, 1998).

Muitos alimentos apresentam pH ao redor de pH 4,7 e nesta região de pH o ácido fítico adquire cargas negativas e confere alto poder de complexação com moléculas de cargas positivas. Em pH menor do que 3,0 o ácido fítico forma ligações eletrostáticas com proteínas de cargas positivas e resulta em complexos solúveis (CHERYAN, 1980). Em pH 7,4 o ácido fítico forma complexos insolúveis com cátions polivalentes, tais como Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} e Ca^{2+} (VOHRA *et al.*, 1965).

3.2 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DE ÁCIDO FÍTICO

O ácido fítico pode ser extraído com vários tipos de solventes a partir de diferentes grãos e outras fontes de origem vegetal. Para extração de ácido fítico com finalidade de sua quantificação, diferentes condições de extração foram estabelecidas.

A extração de ácido fítico em feijões verdes ou maduros utilizando como meio extrator soluções de HCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ou HClO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ foram comparadas por Makower (1970) e observaram que o HCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ foi mais eficiente do que com HClO_4

0,5 mol.L⁻¹ para grãos maduros ou quase maduros, cujo teor de ácido fítico foi relativamente maior.

Wheeler e Ferrel (1971) investigaram o uso do ácido tricloroacético (TCA) 0,2 mol.L⁻¹ para extrair o ácido fítico em grãos de trigo e partes do grão e compararam a extração com HCl e detectaram que a extração de fósforo fítico foi maior quando utilizado TCA 0,2 mol.L⁻¹. Observaram que no extrato utilizando solução de HCl quando o pH foi ajustado para 6,0, houve formação de grande quantidade de flocos brancos devido ao complexo proteína-ácido fítico, o que não ocorreu na extração de ácido fítico com TCA 0,2 mol.L⁻¹.

Ellis e Morris (1986) extraíram o ácido fítico de 2 g de soja, cereais e seus derivados e de fezes humanas utilizando 40 mL de HCl 1 mol.L⁻¹ ou 2 mol.L⁻¹ adicionado de 0,70 mol.L⁻¹ de sulfato de sódio, a temperatura ambiente, por uma noite. O HCl foi utilizado também para extração de ácido fítico de soja, milho, cevada, trigo, farelo de trigo e café torrado por Bos *et al.* (1991), que utilizaram 2,0 g de amostra para 20 mL de HCl 0,8 mol.L⁻¹, por 2 h a temperatura ambiente. Morris e Hill (1996) utilizaram 0,4 a 0,6 g de legumes *in natura*, secos ou pulverizados para 6 mL de HCl 0,5 mol.L⁻¹ a temperatura ambiente, por uma noite. Febles *et al.* (2001) utilizaram as mesmas condições de Ellis e Morris (1986) diferindo apenas no tempo de extração de ácido fítico de 90 min sob agitação constante de 400 amostras de alimentos infantis. Park *et al.* (2006) para quantificar o teor de ácido fítico de frutas, legumes e preparados alimentícios infantis utilizaram 5,0 g de amostra previamente desengorduradas com clorofórmio-metanol (2:1 v/v) para 15 mL de HCl 2,4 mol.L⁻¹, exceto para quantificação por HPLC, em que foi empregada a concentração de HCl 0,5 mol.L⁻¹.

Para extração de ácido fítico de farinha de soja com ácidos fortes ou fracos Han (1988) observou que não havia relação entre a concentração do ácido utilizada e o teor de ácido fítico extraído. Lavagens com HCl 1 mol.L⁻¹ removeram 87 % dos fitatos da soja, ou seja, 1,92 %, cujo teor inicial era de 2,2 % e quando utilizado HCl na concentração de 0,1 ou 0,01 mol.L⁻¹, o teor de ácido fítico extraído foi de 0,30 e 1,41 %, respectivamente. Quando utilizado ácidos fracos como H₃PO₄ ou HCOOH nas concentrações de 1,0 mol.L⁻¹ o teor de ácido fítico extraído foi de 0,43 e 0,24 %, respectivamente. Porém, quando utilizada a concentração de 0,01 mol.L⁻¹ de H₃PO₄ ou HCOOH, o teor extraído de ácido fítico foi de aproximadamente 1,45 % para ambos os ácidos.

Diferentes fatores que influenciam a extração e rendimento do ácido fítico de farelo do arroz extrusado foi investigado por Fuh e Chiang (2001) no qual utilizaram soluções de HCl com pH de 1 a 6, proporção sólido-líquido de 1:25 a 1:5, temperatura de

extração de 25, 40 e 55°C e tempo de 1, 3 e 5 h. Uma eficiente extração do ácido fítico foi observada quando utilizou-se solução de HCl com pH 2,0 como extrator e devido a redução da formação do complexo ácido fítico-proteínas e ácido fítico-amido na extrusão. A extração do ácido fítico diminuiu com altas temperaturas e concluíram que o melhor processo de extração de ácido fítico deveria ser conduzido a 25 °C por 30 min e nestas condições obtiveram extração de 94 % de ácido fítico. Quanto à proporção sólido-líquido o teor de ácido fítico extraído aumentava com acréscimo do volume do solvente, porém, até a proporção de 1:15 pois acima desta proporção de solvente ocorria redução na rendimento do ácido fítico extraído.

Descrições de processos de obtenção de ácido fítico (KIMURA *et al.*, 1971) e fitina (KOLCHEV, 1978) a partir do farelo de arroz foram registrados somente por meio de patentes. Kimura *et al.* (1971) descreveram em sua patente diferentes processos de obtenção de fitina de farelo de arroz integral e desengordurado empregando diferentes ácidos como o H₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹, HCl 1,25 mol.L⁻¹ ou ácido acético 0,35 mol.L⁻¹ e obtiveram rendimentos superior a 94 % na forma de fitato de amônio-cálcio-magnésio, fitato de potássio-magnésio-cálcio ou fitato sódio-cálcio-magnésio. Kolchev (1978) estabeleceu um método para produção de fitato no qual o ácido fítico foi extraído de diferentes fontes vegetais como farelo de arroz, semente de girassol, soja e trigo. O farelo de arroz com 2,0 % de ácido fítico foi utilizado para extração a partir de 100 g de amostra em 500 mL de HCl 0,1 mol.L⁻¹ e pH 1,0 por 2 h. O rendimento tecnológico do processo de extração foi de 93 % em relação ao conteúdo inicial de ácido fítico.

3.3 BENEFÍCIOS E APLICAÇÕES DO ÁCIDO FÍTICO

Um elevado número de compostos de origem vegetal apresenta propriedades antioxidantes no corpo humano, dentre estes o ácido fítico (PETERSON, 2001), que foi considerado por muitos anos, um antinutriente devido a sua capacidade de se ligar a proteínas, amido e principalmente a cátions bivalentes (JENAB; THOMPSON, 2002).

O ácido fítico forma complexos com o zinco, ferro, cobre e manganês que apresentam baixa solubilidade (WINDISCH, 2002) e a disponibilidade desses minerais diminui no organismo (MAGA, 1982; GRAF, 1983; ERDMAN, 1987). Porém, esta característica do ácido fítico representa um problema nutricional somente em dietas

nutricionalmente pobres ou com baixa diversidade de nutrientes (LOPEZ *et al.*, 2002). Lott *et al.* (2002) investigaram os efeitos negativos do ácido fítico à saúde humana e verificaram que foram mais pronunciados em indivíduos que receberam dietas compostas basicamente de sementes, grãos e vegetais. Uma vez que a absorção de minerais em uma dieta balanceada é estimulada pela presença de ácido ascórbico, beta-caroteno, carboidratos fermentados ou ácidos orgânicos, e devem-se considerar ainda possíveis interações entre os minerais que determinam a sua biodisponibilidade (LOPEZ *et al.*, 2002).

Forbes *et al.* (1984) sugeriram que o fitato provavelmente não exerce efeito significativo na biodisponibilidade de zinco em humanos que ingeriram uma dieta adequada. Os ensaios com ratos que receberam uma dieta contendo uma relação de fitato:zinco abaixo de 30 evidenciaram que ocorreu um efeito mínimo sobre o zinco ósseo e geralmente, nas dietas normais de humanos a relação entre fitato:zinco não excedeu a razão de 24.

Muitos benefícios podem estar associados à ingestão de fitatos, principalmente para indivíduos que tem elevado consumo de carne vermelha, uma vez que o ácido fítico é um forte quelante de ferro e devido à correlação do ferro com diversos tipos de câncer (WEINBERG, 1994). O potencial mecanismo de ação anticancerígena do ácido fítico inclui alteração genética, aumento do sistema imune e propriedades antioxidantes (FOX; EBERL, 2002). Entretanto, seu mecanismo de ação não foi totalmente esclarecido (JENAB; THOMPSON, 2002).

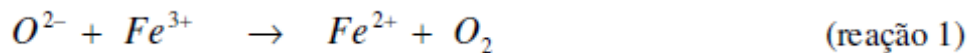
Em estudos com animais, o ácido fítico demonstrou inibir o desenvolvimento de células neoplásicas de vários tipos de câncer, incluindo de fígado (VUCENIK *et al.*, 1998), próstata (SHAMSUDDIN *et al.*, 1997), mama (SHAMSUDDIN; VUCENIK, 1999), pele (BODE; DONG, 2000) e cólon (JENAB; THOMPSON, 2000; STEER; GIBSON, 2002; VERGHESE *et al.*, 2006; NORAZALINA *et al.*, 2009). Norazalina *et al.* (2009) verificaram que o ácido fítico do farelo de arroz reduziu o risco de câncer de cólon em ratos.

Setenta e dois ratos, divididos em seis grupos, os quais foram submetidos a injeções intraperitoneais de azoximetano (AOM) para indução tumoral. Após a fase de pós-iniciação do câncer os animais receberam na água para beber concentrações de 0,20 e 0,50 % de ácido fítico. Após oito semanas, o cólon dos animais foi analisado e observaram que a concentração de 0,50 % de ácido fítico reduziu o número de focus de criptas aberrantes em 71 % e quando administrada a concentração de 0,20 %, houve redução em 61 %. Shamsuddin *et al.* (1997) descreveram que populações alimentadas com dietas ricas em vegetais apresentaram baixa incidência deste tipo de câncer. Melanomas são também inibidos pelo IP₆

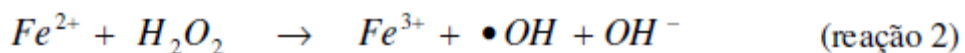
(RIZVI *et al.*, 2006) que reduz o desenvolvimento e induz a diferenciação de células endoteliais vasculares inibindo a produção do fator angiogênico VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) de células epiteliais malignas (VUCENIK *et al.*, 2004).

A habilidade do fitato em ligar-se a metais, particularmente ao ferro, pode explicar sua ação antioxidante e anticarcinogênica (MESSINA, 1991). O fitato é um poderoso inibidor da produção de radical hidroxil (*OH) mediada pelo ferro, devido a sua capacidade de formar quelato com o mesmo tornando-o cataliticamente inativo (GRAF; EATON, 1985). Além disso, o ácido fítico altera o potencial redox do ferro mantendo-o na forma férrica (Fe³⁺). Este efeito oferece proteção contra danos oxidativos, visto que o Fe²⁺ causa produção de oxiradicais e peroxidação de lipídios, enquanto o Fe³⁺ é relativamente inerte (GRAF *et al.*, 1987; EMPSON *et al.*, 1991).

Em estudos realizados por Graf *et al.* (1987) concluíram que o ácido fítico é um antioxidante efetivo e economicamente viável na preservação de materiais biológicos sensíveis ao oxigênio. Dentro deste contexto, é de especial interesse a reação de Fenton (GRAF *et al.*, 1984), importante por gerar *in vivo* espécies reativas de oxigênio (formação de radicais livres catalisada por metais de transição) conforme a reação 1.



Paralelamente à reação de Fenton, traços de Fe³⁺ podem reagir com peróxido de hidrogênio especialmente se estiverem ligados a certos quelantes, embora esta seja uma reação mais lenta do que aquela com Fe²⁺, conforme a reação 2.



Desta forma, os sistemas de Fenton são especialmente relevantes em patologias nas quais se verifica o acúmulo de ferro, como por exemplo, a hemocromatose e a beta-talassemia, já sendo bem conhecida a correlação existente entre estas enfermidades e os efeitos oriundos de danos oxidativos (BACON; BRITTON, 1990).

Para uma nutrição regular e balanceada são necessários de 300 - 500 mg/dia de fósforo nos primeiros anos de vida e 800 - 1200 mg/dia para adolescentes e adultos segundo Lott *et al.* (2002). Destacam-se entre os benefícios da ingestão de alimentos ricos em ácido fítico, o seu efeito hipocolesterolêmico, anti-hipertensivo (HASLER *et al.*, 2000) e para aqueles que sofrem de cálculo renal (JENAB; THOMPSON, 2002). Pode ainda, ser utilizado no tratamento da diabetes (JENAB; THOMPSON, 2002; LEE *et al.*, 2006) devido a inibição da digestão do amido, através de ligações do amido por pontes de hidrogênio, indiretamente

via ligação a proteínas, ou por inibição da digestão por ligação a amilase ou cofatores enzimáticos como o Ca^{2+} .

O ácido fítico é rotineiramente empregado em vários países, como os países da União Européia e Japão como antioxidante em carnes, pastas de peixes, enlatado de pescados, frutas, vegetais, queijos, missô, molho de soja, sucos, pães e em bebidas alcoólicas para prevenir a descoloração, melhorar a qualidade nutricional e prolongar a validade destes produtos.

Reconhecido em 1997 como GRAS (Generally Recognised as Safe) pela FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos e tem sido usado como um aditivo em produtos de panificação. No *Codex Alimentarius* o ácido fítico foi revisado como antioxidante com INS (*System for Food Additives*) número 391 (HIX *et al.*, 1997; POKORNY *et al.*, 2001).

Em carnes, a capacidade quelante do ácido fítico tem fundamentado diversos estudos aplicados à proteção contra danos oxidativos de emulsões, aumentando sua validade. Empson *et al.* (1991) demonstraram que a adição de $0,75 \text{ mmol.L}^{-1}$ de ácido fítico em alimentos diminui as mudanças oxidativas induzidas pelo ferro e demonstraram que o ácido fítico atuou na inibição das transformações oxidativas, com redução da degradação de ácido ascórbico e diminuição da peroxidação lipídica na carne de frango.

O ácido fítico em diferentes concentrações e pH de 5,0 a 8,0 foi comparado ao ascorbato, BHT e EDTA em carne homogeneizada por Lee e Hendricks (1995). O ácido fítico foi descrito como o inibidor mais eficiente na peroxidação lipídica. Os resultados indicaram que 2 mmol.L^{-1} de ácido fítico inibiram a peroxidação lipídica, acelerando a autooxidação do íon ferroso a férrico, formando quelato com ferro e tornando-o cataliticamente inativo. Provavelmente, o ácido fítico removeu o íon ferroso da mioglobina e preveniu a autooxidação dos fosfolipídeos e formação de *off-flavors*. O efeito antioxidante foi dependente da concentração e pH, sendo mais efetivo no pH próximo do neutro ou mais elevado.

Lee *et al.* (1998) verificaram o potencial antioxidante do ácido fítico ao compará-lo ao pirofosfato de sódio e tripolifosfato de sódio, em que o fitato de sódio não diferiu significativamente dos outros antioxidantes quando realizada a análise do teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) em carne bovina reestrutura armazenada por 1 dia a 2°C , e todos diferiram da amostra sem antioxidante (controle). O fitato de sódio se mostrou mais eficiente do que os outros antioxidantes testados em carne reestruturada cozida.

Em estudos realizados por Soares *et al.* (2004) foi verificado que a adição de 2 mmol.L⁻¹ de ácido fítico como antioxidante complementar em filés de peito de frango suplementados com vitamina E inibiu o desenvolvimento de WOF (*Warmed of Flavour*) em até 95,30 %, por 5 dias sob armazenamento a 6 °C. Tais resultados demonstraram uma reação sinérgica entre os dois antioxidantes, sendo que o ácido fítico atuou na fase da propagação, enquanto que o a-tocoferol endógeno, nas fases iniciais do fenômeno da peroxidação lipídica.

Stodolak *et al.* (2007) verificaram o potencial antioxidante do ácido fítico em homogenatos de carnes bovina ou suína crus ou cozidos estocados por três dias a 4 °C e recomendaram o ácido fítico como aditivo alimentar para prolongar a estabilidade de carnes, especialmente as cozidas.

O germe de milho contendo ácido fítico, foi adicionado na dieta de suínos por Harbach *et al.* (2007) e verificou-se uma inibição da rancidez da carne com manutenção da performance do crescimento e saúde destes animais. O potencial antioxidante do ácido fítico do germe de milho também foi confirmado por Filgueiras *et al.* (2009), pela atividade de sequestro de radicais livres e quelação de metais por meio de ensaios de deoxirribose e batofenantrolina. O sequestro do radical hidroxil e a atividade quelante para o Fe²⁺ foi dependente da concentração do ácido fítico sendo que a quelação aumentou com o tempo de contato com o Fe²⁺.

3.4 OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CARNES

A oxidação lipídica ocorre em lipídios que contêm ácidos graxos insaturados e que podem sofrer oxidação, degradação e polimerização por mecanismos de radicais livres (GRAY *et al.*, 1996) e é um fator limitante na qualidade e aceitabilidade de carnes e produtos cárneos (MORRISSEY *et al.*, 1998). O processo de rancidez causa o desenvolvimento de sabores indesejáveis, descoloração, produção de substâncias potencialmente tóxicas como o malonaldeído, que é o maior produto secundário da oxidação lipídica (GRAY *et al.*, 1996; MORRISSEY *et al.*, 1998; KANATT *et al.*, 2007) e que apresenta efeito citotóxico, carcinogênico e mutagênico, além de óxidos de colesterol e perda do valor nutritivo devido à destruição de vitaminas e ácidos graxos essenciais (GRAY *et al.*, 1996; MORRISSEY *et al.*, 1998; KANATT *et al.*, 2007).

Logo após a morte do animal, inicia-se o processo de peroxidação autocatalítica, devido à falta da corrente sanguínea e a consequente falha no aporte do sistema antioxidante natural. O grau e a extensão deste processo são influenciados pelos eventos pré-abate, tais como a alimentação e estresse, bem como por eventos pós-abate, como pH, temperatura da carcaça, encolhimento pelo frio e outros. A oxidação dos lipídios em sistemas musculares é iniciada nas frações dos fosfolipídeos ao nível das membranas subcelulares (mitocôndrias e microsossomos), ricas em ácidos graxos polinsaturados (TERRA, 1998; OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2006).

O termo radical livre refere-se ao átomo ou molécula que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Nas moléculas, os elétrons em geral se reúnem em pares. Um par de elétrons é mais estável do que quando desemparelhados. A falta de elétron com *spin* positivo ou negativo confere alta reatividade às moléculas, provoca reações em cadeia e desestabiliza as ligações das substâncias do meio molecular (THOMAS, 2000). Estes são formados em um cenário de reações de óxido-redução, isto é, ou cede o elétron, oxidando-se, ou recebe, reduzindo-se. Portanto, os radicais livres ou provocam as reações de óxido-redução ou resultam delas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Ainda, causam danos ao DNA, levando ao desenvolvimento de células cancerosas e arteriosclerose (PETERSON, 2001).

A reação em cadeia de radicais livres, na rancificação oxidativa ocorre em três etapas ou fases que são distinguíveis pelos produtos formados e pelas características sensoriais de cada uma das fases. Na primeira fase inicial ou de indução, em que não há odor ou gosto de ranço, formam-se os primeiros radicais livres; a segunda fase, ou de propagação, já apresenta odor e sabor que aumentam rapidamente e também, há um aumento na quantidade dos peróxidos e de seus produtos de decomposição; a terceira fase ou terminação caracteriza-se por odor e sabor fortes, alterações da cor e da viscosidade do lipídio, bem como da sua composição (POKORNY *et al.*, 2001). Uma vez iniciada, a reação de oxidação lipídica segue em cadeia, e somente termina quando estiverem esgotadas as reservas de ácidos graxos insaturados e o oxigênio do meio (GRAY *et al.*, 1996).

A reação de oxidação lipídica tem uma energia de ativação alta e dificilmente ocorreria se não fosse pela presença de substâncias ou de fatores físicos denominados de prooxidantes que baixam esse nível ou permitem a transmissão de energia às moléculas, permitindo que a reação ocorra com relativa frequência e rapidez. Dentre os mais importantes tem-se os íons de alguns metais pelos seus efeitos múltiplos e pela dificuldade de evitar sua presença nas gorduras, as quais poderão ser contaminadas pelo contato com os

equipamentos utilizados no seu processamento, armazenamento ou durante seu uso. Os íons dos metais de transição, multivalentes, que são oxidados - reduzidos facilmente, são geralmente os mais ativos prooxidantes. O modo de ação mais provável desses íons é por meio de sua interação com hidroperóxidos, originando novos radicais livres ou atuando na formação do oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (GRAY *et al.*, 1996).

Os radicais livres também podem ser gerados durante as funções metabólicas normais, porém as células, por meio de sistemas naturais de defesa constituídos principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e glutathione reduzida (GSH) são protegidas (PETERSON, 2001). Entretanto, sob condições em que há excesso de radicais livres e deficiência no sistema protetor, ocorre um desequilíbrio entre a formação e a remoção destas espécies reativas no organismo, caracterizando o estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O termo antioxidante se refere a qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, atrasa ou inibe consideravelmente a oxidação do substrato (THOMAS, 2000). Uma maneira de combater o estresse oxidativo e a oxidação lipídica consiste na utilização de antioxidantes presentes em alimentos com a propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas (GRAY *et al.*, 1996).

Os antioxidantes comumente utilizados em alimentos são os sintéticos, BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno), PG (propil galato) e TBHQ (terc-butil hidroquinona) (MANCINI-FILHO *et al.*, 1998). O emprego destes antioxidantes tem sido questionado quanto a sua inocuidade e considerando o fato de que os antioxidantes naturais têm recebido atenção especial por nutricionistas e pesquisadores da área médica por seus efeitos na prevenção de doenças crônicas e degenerativas (LIU, 2003), há uma tendência geral no processamento de alimentos em substituir os antioxidantes sintéticos por inibidores naturais da oxidação, ou seja, pelo uso de ingredientes alimentares que naturalmente possuem atividade antioxidante (MANCINI-FILHO *et al.*, 1998). Entre os antioxidantes naturais destacam-se: ácido ascórbico (FRANKEL, 1996), β -caroteno, compostos fenólicos (KANATT *et al.*, 2007), vitamina E (FRANKEL, 1996; OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2006) e ácido fítico (GRAF *et al.*, 1987; GRAF; EATON, 1990; EMPSON *et al.*, 1991; LEE; HENDRICKS, 1995; LEE *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 1998; HARBACH *et al.*, 2007; STODOLAK *et al.*, 2007; FILGUEIRAS *et al.*, 2009).

No Brasil a aplicação de antioxidantes em carnes e produtos cárneos é regulamentada pela Portaria n.1004 de 11 de dezembro de 1998, sendo que para carnes frescas e congeladas não é permitido o uso de nenhum aditivo e para produtos cárneos, os antioxidantes permitidos cujo limite de uso é a quantidade suficiente, são o ácido ascórbico (INS 301), ascorbato de sódio (INS 302) ou de cálcio (INS 303) ou potássio (INS 315) e o ácido eritórbico ou ácido isoascórbico (INS 320). Os antioxidantes que tem seu limite de uso estabelecido em 0,01 % são o BHA (INS 320), BHT (INS 321) e galato de propila (INS 310) (BRASIL, 1998). Embora, o ácido fítico seja permitido e empregado em muitos países, no Brasil sua aplicação como antioxidante em produtos cárneos e outros produtos alimentícios não está previsto e regulamentado.

3.5 CARNE MECANICAMENTE SEPARADA DE AVES

A carne mecanicamente separada (CMS) ou carne mecanicamente desossada (CMD) é o termo genérico utilizado para descrever a separação ou desossa da carne que permanece firmemente aderida aos ossos após o processo de retirada dos cortes cárneos. É um processo relativamente simples em que são utilizados os ossos mais difíceis de serem totalmente desossadas de forma manual, como as carcaças, partes de carcaças, ossos inteiros ou previamente moídos que são pressionados contra uma superfície perfurada, resultando em um produto finamente cominuído (CROSLAND *et al.*, 1995). A carne e outros tecidos comestíveis atravessam as fendas ou orifícios, enquanto que as partículas ósseas, exceto aquelas muito pequenas, não atravessam. Os ossos resultantes deste processo podem ser utilizados para ração animal. Segundo Ranken (2000), nos abatedouros de aves nos Estados Unidos pode ocorrer a presença na carne mecanicamente separada a presença de pequenos fragmentos de ossos de forma granular de tamanho não superior a 0,5 mm e um teor de cálcio não superior a 0,02 %.

A medula óssea é o principal local de formação do sangue, sendo por esta razão rica em hemoglobina e, portanto contribui para a cor vermelha da CMS, sendo consideradas as hemoproteínas os principais catalisadores da oxidação lipídica em CMS de frango Lee *et al.* (1975). O outro pigmento vermelho presente nas CMS é a mioglobina, proveniente dos músculos. Logo após a desossa, devido ao oxigênio incorporado durante este processo, ambos os pigmentos estão na forma oxigenada, a oxi-hemoglobina e a

oximioglobina, de cor vermelho brilhante. É esta a melhor condição para a utilização de CMS em produtos cárneos, enquanto os pigmentos ainda não estão oxidados. Altos níveis de hemoglobina e mioglobina (pigmentos heme) em CMS podem tornar-se um problema durante a estocagem, porque estes pigmentos podem ser oxidados (FIELD, 1988).

Tanto a mioglobina como a hemoglobina são proteínas globulares com um grupo prostético heme (ANTONINI, 1965). Na CMS, os pigmentos de cor sofrem mudanças devido a sua reação com o oxigênio. A mioglobina pode sofrer oxidação pelo oxigênio, com o ferro heme sendo convertido para o estado férrico. A forma oxidada de mioglobina, a metamioglobina não pode ligar ao oxigênio reversivelmente e assim é fisiologicamente inativa. A metamioglobina é de cor marrom escuro (WALLACE *et al.*, 1982). A oxidação da mioglobina é acelerada por íons metálicos tais como cobre ou ferro, que podem estar presentes na água ou derivados de equipamentos utilizados no processamento da carne (LYNCH *et al.*, 1999).

A oxidação do pigmento heme juntamente com a oxidação lipídica são consideradas importantes causas da deterioração da CMS, levando a muitos efeitos adversos nas suas características de qualidade como, sabor, aroma, cor, textura e valor nutritivo (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2006). Ambas as reações são difíceis de serem controladas, principalmente devido a sua complexidade e variabilidade. São reações de ordem físico-química, que podem ser potencializadas por ação microbiológica (OLIVO, 2006).

Os fatores relacionados ao equipamento utilizado na elaboração da CMS podem afetar sua qualidade, como por exemplo, a pressão aplicada sobre a matéria-prima, que quando aumenta, implica em um produto final com maior quantidade de osso, tendões e outros resíduos não cárneos. O rendimento da CMS de aves varia de 55 a 70 %. Quanto maior o rendimento maior a porcentagem de cinzas e lipídios, além de elevar a temperatura do produto final que promove a desnaturação das proteínas, o que pode afetar sua funcionalidade, diminuir a qualidade bacteriológica e conseqüentemente reduzir a vida útil (FRONING; McKEE, 2001).

A composição centesimal da CMS depende principalmente do tipo de matéria-prima utilizada na sua fabricação. Dos seus constituintes merece atenção a gordura, capaz de apresentar variação no seu conteúdo, que se reflete diretamente tanto na estabilidade da emulsão cárnea como nos processos oxidativos (TERRA, 1998). A menor qualidade da fração lipídica da CMS representa um problema quando o produto permanece congelado por muito tempo (FIELD, 1988).

A Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, define a Carne Mecanicamente Separada (CMS), como a carne obtida por processo mecânico de moagem e separação de ossos de animais de açougue, destinada a elaboração de produtos cárneos específicos. Tem como características físico-químicas: proteína (mínimo) de 12 %, gordura (máximo) de 30 %, teor de cálcio (máximo) de 1,5 % (base seca), índice de peróxidos (máximo) de 1 mEq KOH por kg de gordura; e ainda, 98 % dos ossos deverão ter diâmetro máximo de 0,5 mm e largura máxima de 0,85 mm (BRASIL, 2000).

A CMS quando não utilizada diretamente como ingrediente em um produto cárneo, logo após o processo de separação mecânica, a mesma deverá ser refrigerada a uma temperatura não superior a + 4 °C por no máximo de 24 h. Se armazenada no máximo até 0 °C poderá ser utilizada em até 72 h após sua obtenção. E caso seja congelada, deverá ser em blocos com espessura máxima de 15 cm e conservada em temperatura não superior a -18 °C no prazo máximo de 90 dias (BRASIL, 2000).

Devido à grande disponibilidade deste tipo de carne de aves (frangos, galinhas de descarte, perus) a CMS vêm sendo utilizadas em larga escala na fabricação de embutidos cárneos. Negrão *et al.* (2005) demonstraram que a CMS apresenta boas propriedades nutricionais, se comparada à farinha de peito de frango, apesar de ser pobre em lisina. Porém, devido às alterações químicas e estruturais sofridas no processo de separação mecânica, tornam-se muito susceptíveis a processos deteriorativos. Fatores como gorduras insaturadas, pigmentos heme, redução e partículas finas e incorporação de ar levam ao desenvolvimento de aromas indesejáveis (rancidez), devido à oxidação lipídica e à perda da cor vermelha característica, pela oxidação dos pigmentos.

Os antioxidantes alternativos podem ser utilizados para controlar a rancidez oxidativa da CMS. Mielnik *et al.* (2003) provaram ser vantajosa a adição de antioxidantes comerciais a base de alecrim, vitamina E e ácido ascórbico no controle da oxidação lipídica em CMS de peru congelada por 7 meses. As amostras de CMS contendo os antioxidantes foram comparadas a amostras sem antioxidantes (controle), e constataram o efeito retardador dos antioxidantes na peroxidação lipídica nas condições investigadas. Tuboly *et al.* (2003) utilizaram alta pressão hidrostática em CMS de perus e observaram nas condições estudadas, significativa redução de células viáveis de microrganismos aeróbicos, porém, houve um aumento nos valores de TBARS e formação de produtos da oxidação do colesterol. Sadat e Volle (2000), Gomes *et al.* (2003a) e Gomes *et al.* (2003b) demonstram a viabilidade do uso de irradiação visando a pasteurização da CMS de frango. Hassan e Fan (2004) utilizaram

extratos de folhas de cacau e investigaram o teor de fenóis, catequinas e capacidade de reduzir o Fe^{3+} e concluíram que concentrações de 200 a 400 mg/kg de extrato de folhas de cacau apresentaram 50 a 80 % do efeito antioxidante de 200 mg de butil hidroxianisol (BHA) / butil hidroxitolueno (BHT) (1:1). Rossini *et al.* (2009) verificaram a ação antioxidante de peptídeos da caseína com diminuição em 21 % da oxidação lipídica da CMS de frango quando comparada a CMS o antioxidante.

3.6 EMBUTIDOS CÁRNEOS

O processo de elaboração de produtos cárneos é realizado desde a antiguidade e apresenta-se, neste início de século, ainda como um desafio na melhoria contínua dos produtos processados (SHIMOKOMAKI *et al.*, 2003). A fabricação de embutidos cárneos propicia o aumento da vida útil das carnes, bem como diversifica a oferta de derivados. A produção de embutidos apresenta-se como uma das soluções para atender à demanda por qualidade (TERRA *et al.*, 2004). Um dos maiores desafios para a indústria cárnea é oferecer produtos macios, suculentos e com cor e sabor agradáveis e que estas características de frescor mantenham-se estáveis durante toda a sua vida útil, com a maior segurança e menor custo possíveis (OLIVO, 2006).

Os produtos cárneos emulsionados como as salsichas e mortadelas, são bastante populares, sendo consumidos tanto a nível doméstico como no mercado de alimentação rápida, representando um importante segmento das carnes industrializadas. Estima-se um consumo *per capita* de aproximadamente 5 kg/ano de produtos cárneos emulsificados, mostrando fazer parte integrante da dieta do brasileiro e conseqüentemente, apresentam considerável importância na economia (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2006). Segundo a legislação brasileira, mortadela é o produto cárneo industrializado, obtido de uma emulsão de carnes de animais de açougue, acrescido ou não de toucinho, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, em diferentes formas, e submetido ao tratamento térmico adequado (BRASIL, 2000).

Os produtos cárneos, devido a sua composição são altamente suscetíveis a alterações de ordem físico-química e microbiológica. Dentre as principais alterações e suas consequências estão a oxidação lipídica e a oxidação de cor, que são difíceis de serem controladas, devido sua complexidade e variabilidade (OLIVO, 2006).

A relação entre a oxidação de lipídios e a oxidação da cor é de extrema importância na indústria cárnea. No entanto, a causa-efeito desta relação entre estes dois processos não está completamente esclarecida, especialmente para carnes processadas, e não se sabe quando ou a oxidação lipídica causa a oxidação da cor ou vice-versa (ZANARDI *et al.*, 2002). O ferro da mioglobina no seu estado oxidado pode catalisar a oxidação lipídica, a qual também pode ser induzida por outros componentes que possuem ferro e pelo ferro livre. Por outro lado, os radicais livres, produzidos durante a oxidação lipídica podem oxidar o ferro ou desnaturar a molécula de mioglobina, alterando negativamente a cor dos produtos. O rompimento da integridade das membranas musculares pela desossa mecânica, moagem, reestruturação ou cozimento, liberam o ferro cataliticamente ativo da mioglobina e de outras proteínas. A interação deste e de outros agentes prooxidantes com os ácidos graxos polinsaturados, resulta na geração de radicais livres e na propagação das reações oxidativas. Assim, os produtos reestruturados e cozidos apresentam grande possibilidade oxidativa (OLIVO, 2006).

As mortadelas por serem embutidos cárneos em que é permitida a adição de até 60 % de CMS (BRASIL, 2000) são altamente suscetíveis às alterações químicas que depreciam a sua qualidade (MIELNIK *et al.*, 2003). A utilização de antioxidantes é importante para amenizar os efeitos oxidativos indesejáveis e auxiliar na qualidade do produto durante sua vida útil (OLIVO, 2006).

A aplicação de ácido fólico do farelo de arroz como antioxidante em CMS ou na formulação de embutido cárneo ainda não foi descrita na literatura. A adição destes novos aditivos em substituição aos antioxidantes sintéticos poderá beneficiar a saúde do consumidor e contribuir no aspecto tecnológico de produtos cárneos com aumento da validade e qualidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matéria-Prima

Foi utilizado como matéria-prima o farelo de arroz integral da cultivar IRGA 417 fornecido pelo Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA) de Cachoeirinha/RS da safra 2007/2008. A carne mecanicamente separada foi proveniente do Abatedouro de Aves Lar, localizado na cidade de Matelândia - PR. Para a elaboração do embutido cárneo, a matéria-prima e os ingredientes foram fornecidos pelo Frigorífico Frimesa, localizado na cidade de Medianeira - PR. A elaboração dos embutidos cárneos se deu no Laboratório de Industrialização de Carnes da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Campus Medianeira.

4.1.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica de diferentes procedências comerciais, sendo que o padrão de ácido fítico foi o fitato de dodecassódio de arroz com pureza > 90 % da Sigma (P0109/Sigma, St.Louis, USA).

4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1 Preparo de Amostra de Farelo de Arroz para Extração de Ácido Fítico

O farelo com granulometria acima de 80 mesh, não sofreu nenhum processo de moagem. As amostras foram armazenadas em embalagens de polietileno transparentes, seladas e congeladas a -18 °C até o momento de uso.

4.2.2 Determinação do Teor de Ácido Fítico

O ácido fóico foi extraído em HCl 0,8 M, na proporção de 1:10 (m/v) e agitação constante por 2 h. O material foi centrifugado a 400xg por 10 min e obtido o sobrenadante que foi adequadamente diluído com água destilada. O teor de ácido fóico foi quantificado conforme o procedimento descrito por Latta e Eskin (1980), com modificação da resina para Dowex-AGX-4, proposto por Ellis e Morris (1986). No procedimento para cromatografia de troca iônica, foi utilizada uma coluna de vidro de 10 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro contendo 0,6 g da resina que foi previamente preparada com eluições sucessivas de 10 mL de água destilada, 10 mL de NaCl 0,7 mol.L⁻¹ e 10 mL de água destilada. Em seguida, uma alíquota de 2 mL do sobrenadante foi aplicada na coluna, eluída com 10 mL de NaCl 0,1 mol.L⁻¹ e 10 mL de NaCl 0,7 mol.L⁻¹ e recolhido 10 mL do último eluato. A partir deste eluato, alíquotas de 3 mL foram transferidas para tubos de ensaios e adicionado 1 mL do reativo de Wade (ácido sulfosalicílico e cloreto férrico). A leitura do complexo formado foi realizada em espectrofotômetro UV-Visível (Modelo Libra S22, Marca Biochrom) a 500 nm. O resultado foi expresso em g de ácido fóico em 100 g ou mL de amostra.

4.2.3 Determinação de Umidade

O teor de umidade do farelo de arroz foi determinado conforme descrição da *Association of Oficial Analytical Chemists* (AOAC, 2005).

4.2.4 Planejamento Experimental para Extração de Ácido Fóico do Farelo de Arroz

Para extração de ácido fóico do farelo de arroz foi utilizado o delineamento fatorial 2⁴ com triplicata no ponto central, totalizando 19 ensaios que foram realizados aleatoriamente. A Tabela 1 apresenta a matriz do planejamento experimental (2⁴). A Tabela 2 apresenta as quatro variáveis independentes, X₁ (concentração de farelo de arroz), X₂

(concentração de ácido clorídrico), X_3 (temperatura), X_4 (tempo) e os níveis de variação. A variável dependente ou função-resposta (Y) foi expressa como g de ácido fítico extraído em 100 g de farelo de arroz. As variáveis independentes e os níveis de variação foram selecionados em função de estudos preliminares e condições de extração de ácido fítico descritas conforme Latta e Eskin, 1980; Han (1988) e Bos *et al.* (1991).

Para análise de regressão e variância e superfície de repostas foi utilizado o *software* STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2004). A fórmula geral do modelo de superfície de resposta foi expressa conforme a Equação 1.

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_4x_4 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{14}x_1x_4 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{24}x_2x_4 + \beta_{34}x_3x_4 + e$$

Equação 1

onde:

\hat{y} = função-resposta

x_1, x_2, x_3 e x_4 = variáveis codificadas

β 's = coeficientes estimados pelo modelo de superfície de resposta

e = resíduo (erro experimental)

Tabela 1 – Matriz dos ensaios do delineamento fatorial 2^4 com as variáveis independentes

Ensaio	Variáveis			
	Farelo de arroz	HCl	Temperatura	Tempo
	x_1	x_2	x_3	x_4
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

Tabela 2 – Variáveis e níveis de variação

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
X ₁ – Concentração de farelo de arroz (g/mL)	0,050	0,075	0,100
X ₂ - Concentração de HCl (mol.L ⁻¹)	0,2	0,6	1,0
X ₃ - Temperatura (°C)	25	50	75
X ₄ - Tempo (h)	1	2	3

4.2.5 Técnica de Purificação de Ácido Fítico do Farelo de Arroz

Após estabelecer a melhor condição de extração do ácido fóico foi desenvolvida uma técnica analítica de sua purificação. A melhor condição de extração foi estabelecida quando se utilizou 20 g de farelo de arroz e 200 mL de HCl 1 mol.L⁻¹, ou seja, a concentração de farelo de arroz foi de 0,100 g/mL, temperatura de 25 °C e tempo de 1 h de extração com rotação de 2xg (Modelo MA 830/A, Marca Marconi). A Figura 2 apresenta o fluxograma de extração e purificação de ácido fóico do farelo de arroz. Após extração do ácido fóico, o pH do meio foi ajustado para 4,5 com NaOH 4 mol.L⁻¹ para precipitação das proteínas. Em seguida, o material foi centrifugado a 2000xg por 10 min e obtido o sobrenadante contendo o ácido fóico e denominado de S₁.

4.2.5.1 Efeito do pH do sobrenadante S₁ para precipitação do ácido fóico

No sobrenadante S1 foi verificada a melhor condição de pH para precipitar o ácido fóico. Para variações de pH de 7,0 a 9,0 e intervalos de 0,5 foram utilizadas soluções de Na₂CO₃ 1,5 mol.L⁻¹ ou NaOH 4 mol.L⁻¹. Após o ajuste de cada pH do sobrenadante S1, o material foi mantido em repouso por 12 h para decantar o precipitado. Os cinco sobrenadantes com os precipitados foram centrifugados conforme condições descritas anteriormente e denominados de sobrenadantes S2 com os respectivos pHs e quantificado o teor de ácido

fítico conforme item 4.2.2. Nos cinco precipitados P₂, o ácido fítico foi ressuspenso com 15 a 20 mL de HCl 1 mol.L⁻¹ e 10 mL de formaldeído e adicionado 0,5 g de terra diatomácea para separar as proteínas do farelo de arroz e agitado (Modelo PC-420D, Marca Corning) por 2 h em capela de exaustão à temperatura ambiente de 22 a 23 °C. Após repouso de 12 h e filtração em papel de filtro qualitativo foram obtidos os sobrenadantes S₃ com os respectivos pHs e os precipitados P₃ descartados. O sobrenadante S₃ com maior teor de ácido fítico foi utilizado para prosseguir com o processo.

4.2.5.2 Efeito do pH do Sobrenadante S₃ para Precipitação do Ácido Fítico

Para verificar qual foi a melhor condição de pH para precipitar o ácido fítico do sobrenadante S₃ foi utilizada solução de Na₂CO₃ 1,5 mol.L⁻¹ com variações de pH de 7,0 a 9,0 e intervalos de 0,5. Após ajuste de pH dos sobrenadantes S₃, o material foi filtrado em papel de filtro qualitativo para obter os respectivos precipitados P₄ e descartados os sobrenadantes S₄. Todos os precipitados de ácido fítico obtidos foram secos em estufa a 60 °C por 24 h e quantificado o seu teor (item 4.2.2) e rendimento (item 4.3.5.3).

Após definir as melhores condições de cada etapa do processo de purificação de ácido fítico foi realizado um processo completo (Figura 2) para confirmar o teor de ácido fítico nos precipitados P₁, P₃ e no sobrenadante S₄.

4.2.5.3 Rendimento do ácido fítico purificado do farelo de arroz

O rendimento foi calculado pela relação entre o teor de ácido fítico do farelo de arroz inicial (AF_i) e teor de ácido fítico obtido (AF_o) multiplicado por 100 (Equação 2).

$$\text{Rendimento de AF (\%)} = \frac{AF_i}{AF_o} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

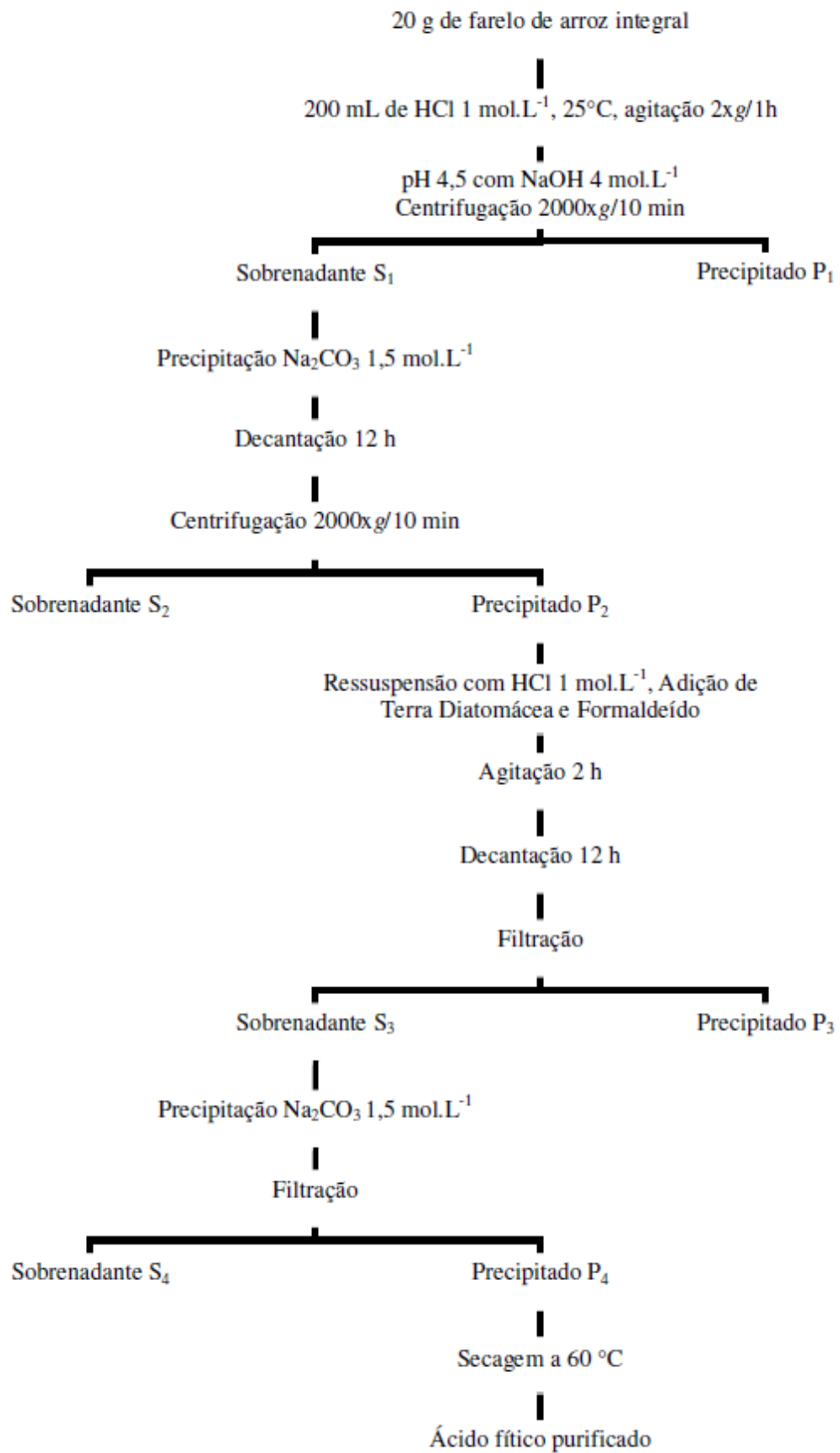


Figura 2 – Processo de extração e purificação de ácido fítico do farelo de arroz

4.2.6 Avaliação do Processo de Purificação de Ácido Fítico Obtido do Farelo de Arroz

4.2.6.1 Teor de fósforo fítico, fósforo inorgânico e fósforo total

A extração e digestão do fósforo fítico do ácido fítico padrão e ácido fítico purificado foram realizadas segundo Thompson e Erdman (1982) e determinado colorimetricamente segundo Chen *et al.* (1956). O fósforo inorgânico foi analisado do sobrenadante obtido após a extração do fósforo fítico e quantificado do mesmo modo que o fósforo total, por espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (modelo OPTIMA 3000 DV, Perkin Elmer), segundo Sousa *et al.* (2005).

4.2.6.2 Teor de proteínas solúveis, nitrogênio e proteínas totais

O teor de proteínas solúveis do ácido fítico padrão e purificado foi determinado segundo Lowry *et al.* (1951). O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl e o fator 6,25 foi utilizado para converter o teor de nitrogênio em proteínas totais (AOAC, 2005).

4.2.6.3 Teor de minerais

A digestão do ácido fítico purificado e padrão foi realizada via seca por incineração em mufla a 550 °C e o resíduo diluído em HCl 6 mol.L⁻¹. A determinação de Cu, Zn, Ni, Co, Mn, Fe, Ca e Mg foi realizada em espectrômetro de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (modelo OPTIMA 3000 DV, Perkin Elmer) segundo Sousa *et al.* (2005). A determinação de Na e K foi realizada em fotômetro de chama (modelo B462, Micronal) conforme descrito por Dean (1960).

4.2.6.4 Solubilidade

A solubilidade do ácido fítico purificado foi investigada nos pHs 4,0, 6,0 e 8,0 em tampão fosfato dissódico e ácido cítrico. Para cada pH foi preparada uma solução saturada de ácido fítico purificado e submetida a agitação constante por 12 h, filtrada em papel de filtro qualitativo segundo Casagrande *et al.* (2007). No filtrado foi quantificado o teor de ácido fítico conforme descrito no item 4.2.2.

4.2.7 Avaliação da Capacidade Antioxidante do Ácido Fítico Purificado do Farelo de Arroz

O ácido fítico purificado foi avaliado em triplicata quanto a sua capacidade antioxidante por meio de determinação da capacidade redutora do íon ferro pelo ácido fítico utilizando a 2,4,6-tripiridil-s-triazina pelo método de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), capacidade queladora do íon ferro pelo ácido fítico utilizando o método da batofenatrolina (BPS) e capacidade inibitória do radical hidroxil pelo ácido fítico utilizando o método de deoxirribose.

4.2.7.1 Capacidade redutora do íon ferro pelo ácido fítico utilizando a 2,4,6-tripiridil-s-triazina pelo método de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

O método de FRAP foi realizado conforme descrição de Sánchez-González *et al.* (2005) com algumas modificações e mede a redução férrica de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) para um produto colorido. Para análise, foram adicionados 3 mL do reagente FRAP e 100 μL de diferentes concentrações de ácido fítico padrão ou ácido fítico purificado (0,028; 0,141; 0,353; 0,706; 1,412; 1,765; 2,824 e 7,060 mg/mL) e realizada a leitura da absorbância à 593 nm (HUANG *et al.*, 2005) após 30 min à 37 °C. O reagente FRAP foi utilizado como branco e preparado com mistura de tampão acetato de sódio 0,3 mmol.L⁻¹ e pH 3,6; solução de TPTZ 10 mmol.L⁻¹ em HCl 40 mmol.L⁻¹ e solução de cloreto férrico 20 mmol.L⁻¹ na proporção de volumes de 10:1:1, respectivamente, no momento da análise. A solução foi

incubada a 37 °C por 30 min. O poder redutor foi expresso como (imol equivalente de Trolox por grama de ácido fítico padrão ou ácido fítico purificado. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.7.2 Capacidade queladora do íon ferro pelo ácido fítico utilizando o método da batofenatrolina (BPS)

A atividade queladora do íon Fe^{2+} pelo ácido fítico foi determinada segundo o método descrito por Bolanm e Ulvik (1987) que utiliza a BPS como um forte quelador de íon ferro e forma um complexo colorido quando ligada a este íon.

Primeiramente, avaliou-se o tempo de contato entre o íon Fe^{2+} e o ácido fítico padrão por diferentes tempos no meio de reação antes da adição de BPS. Neste ensaio, $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ e $50 \mu\text{L}$ de ácido fítico padrão nas concentrações de 4,41; 17,65 e 141,20 Hg/mL foram mantidos em contato por 0, 15, 30, 60 ou 120 min em 2 mL de meio de reação contendo 125mmol.L^{-1} de sacarose, 65mmol.L^{-1} de KCl e 10mmol.L^{-1} de Tris-HCl e pH 7,4 (meio I). Posteriormente, $0,2 \text{mmol.L}^{-1}$ de BPS foram adicionados e a mistura de reação foi mantida a temperatura ambiente por 15 min. A capacidade queladora do ferro foi determinada pela formação do complexo colorido $\text{Fe}_2(\text{BPS})_3$ e leitura em espectrofotômetro em 530 e 700 nm conforme Casagrande *et al.* (2006).

Após definir o melhor tempo de contato de 60 min de reação entre o ácido fítico e íon Fe^{2+} antes da adição da BPS foram preparadas soluções de ácido fítico padrão ou ácido fítico purificado com 3,530 mg/mL em HCl $0,02 \text{mol.L}^{-1}$. Posteriormente, foram diluídas em água deionizada para obter concentrações de 2,2; 4,4; 8,8; 35,3; 88,3; 176,5; 353,0 e 1765,0 Hg/mL. Para determinação da curva de concentração resposta, $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ e $50 \mu\text{L}$ das diferentes concentrações de ácido fítico padrão ou ácido fítico purificado foram mantidos a temperatura ambiente por 60 min em 2 mL de meio I. Em seguida, foram adicionados $0,2 \text{mmol.L}^{-1}$ de BPS e seguiu-se o procedimento conforme descrito anteriormente. Foram feitos concomitantemente o branco (meio de reação) e o controle positivo (meio de reação + Fe^{2+} + BPS). Os ensaios foram realizados em triplicata.

A capacidade antioxidante foi expressa como % de capacidade queladora do íon Fe^{2+} pelo ácido fítico e estimada conforme a equação (3).

$$\text{Capacidade Antioxidante (\%)} = 100 - \left(\frac{100A_a}{A_0} \right) \quad \text{Equação 3}$$

Onde, A_a é a absorvância da amostra (530 nm - 700 nm) e A_0 é a absorvância do controle positivo (530 nm - 700 nm).

4.2.7.3 Capacidade inibitória do radical hidroxil pelo ácido fítico utilizando o método de deoxirribose

A diminuição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico provenientes da degradação do açúcar deoxirribose pelo radical hidroxil gerado pela reação de Fenton foi determinada segundo Halliwell *et al.* (1987). Preparou-se uma solução de ácido fítico padrão a 14,1200 mg/mL em água deionizada, que foi posteriormente diluída nas seguintes concentrações: 0,0282; 0,1412; 0,3530; 0,7060; 1,4120; 1,7650; 2,8240 e 7,0600 mg/mL. Para o ácido fítico purificado preparou-se uma solução saturada em água deionizada que foi filtrada e quantificado o teor de ácido fítico de 2,2800 mg/mL conforme item 2.2.6. O resultado foi expresso em g de ácido fítico em 100 g de amostra. Em seguida, procedeu-se a diluição desta solução obtendo-se as concentrações de 0,0228; 0,0450; 0,0912; 0,2800; 0,2850; 0,4560 e 1,1400 mg/mL.

Em tubos de ensaios foram misturados 1 mL de tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$ (20 mmol.L⁻¹, pH 7,4), 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ascorbato, 500 μL das diferentes concentrações de ácido fítico padrão ou ácido fítico purificado, 2,8 mmol.L⁻¹ de deoxirribose, 1 mmol.L⁻¹ de H_2O_2 , 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de $\text{Fe}_3\text{Cl.6H}_2\text{O}$, 52 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de EDTA e os tubos foram incubados a 37 °C por 30 min. Após este período, 1 mL de TBA 1 % preparado em 50 mmol.L⁻¹ de NaOH, 100 μL de NaOH 10 mol.L⁻¹ e 500 μL de H_3PO_4 4 mol.L⁻¹ foram adicionados aos tubos e incubados a 85°C por 20 min.

Foi avaliada a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico a 535 nm a temperatura ambiente, principalmente como malonaldeído (MDA) devido à degradação de deoxirribose causada pelo radical hidroxil. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 535 nm a temperatura ambiente de 22 a 23°C. Foram feitos concomitantemente o branco (ausência de deoxirribose), o controle positivo (ausência de

ácido fítico) e acompanhado com um controle negativo (ausência de ferro). Assim, a atividade antioxidante foi expressa como porcentagem (%) de inibição do radical hidroxil pelo ácido fítico e estimada conforme a Equação 3.

4.2.7.4 Precisão dos métodos analíticos

A precisão da análise para a determinação da capacidade queladora do íon ferro pelo ácido fítico padrão utilizando o método de BPS foi determinada pela repetibilidade (intra-ensaio) e precisão intermediária (inter-ensaio). A repetibilidade, para o ensaio foi avaliada no mesmo dia por meio de análises de amostras com a mesma concentração (40 e 180 $\mu\text{g/mL}$ de ácido fítico padrão). A precisão intermediária foi determinada nas mesmas concentrações e comparadas as análises em 3 dias diferentes. A repetibilidade (intra-ensaio) e precisão intermediária (inter-ensaio) do ensaio de deoxirribose foi avaliada por Filgueiras *et al.* (2009) e do método de FRAP não foi determinado por ser negativo para o ácido fítico.

4.2.8 Avaliação do potencial antioxidante do ácido fítico purificado do farelo de arroz em CMS de aves e embutido cárneo

4.2.8.1 Ácido fítico purificado como antioxidante em CMS de frango

O ácido fítico padrão ou purificado foi adicionado na CMS de frango recém preparada no abatedouro. Foram utilizados dois lotes de CMS produzidos em dias diferentes. O lote 1 foi dividido em 5 amostras, sendo uma amostra controle (sem antioxidante), duas amostras com 5 mmol.L^{-1} e 10 mmol.L^{-1} de ácido fítico padrão por kg de CMS e outras duas amostras com 5 mmol.L^{-1} e 10 mmol.L^{-1} de ácido fítico purificado por kg de CMS. O lote 2 foi também dividido em 5 amostras e o preparo de amostra foi similar ao lote 1. Em seguida, 200 g de cada amostra foram colocados em placas de Petri de 100 x 200 mm e protegidas com filme de polietileno e armazenadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Logo após a adição do ácido fítico (tempo zero), as amostras foram armazenadas por 120 dias e em intervalos de 15 dias foram analisados em

triplicata, a oxidação lipídica conforme o item 4.2.8.2 e o aroma de requeijado conforme o item 4.2.8.3.

4.2.8.2 Medida de oxidação lipídica

A oxidação lipídica foi determinada pelo índice de TBARS utilizando 10 g de amostra, segundo a metodologia descrita por Tarladgis *et al.* (1964) e modificado por Crackel *et al.* (1988). Para as amostras de mortadela seguiu-se as recomendações de Shahidi *et al.* (1985) no que se refere a adição de sulfanilamida para as amostras que contêm nitrito.

Para a quantificação em triplicata foram utilizados 10 gramas de amostra submetidos a hidrólise com 98 mL de água deionizada, 2,5 mL de ácido clorídrico 4 mol.L⁻¹ e 2 gotas de antiespumante (8 partes de Span 80 + 1,3 partes de Tween 20), em erlenmeyer de 500 mL. Em seguida, esta solução foi destilada por 10 min e coletados 50 mL de destilado, o qual foi homogeneizado e em triplicata, alíquotas de 5 mL foram transferidas para um tubo de ensaio com tampa rosqueável. Posteriormente, adicionou-se 5 mL de solução de TBA 0,02 mol.L⁻¹ e estes foram colocados em banho-maria a 85°C por 35 min, resfriados a temperatura ambiente e feita a leitura em espectrofotômetro UV - Visível (modelo Libra S22, Marca Biochrom) a 530 nm. Uma curva padrão foi preparada utilizando solução de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) em água deionizada nas concentrações de 0,004 a 1,0 mol.L⁻¹ de TEP. Para verificar a exatidão do método foi realizada a recuperação do mesmo a partir da comparação de absorvâncias da solução padrão, da solução padrão adicionada de amostra e da amostra. Os resultados em triplicata foram expressos em mg de TBARS/kg de amostra.

4.2.8.3 Determinação do aroma de requeijado

O aroma de requeijado ou *Warmed-Over Flavor* (WOF) foi determinado com 10 g de amostra. As amostras foram embaladas em sacos de polietileno e aquecidas em banho-maria fervente por 15 min ou até atingir a temperatura interna de 75 ± 5 °C, conforme procedimento descrito por Igene e Pearson (1979). Em seguida, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e armazenadas por 48h sob refrigeração a 6 ± 1 °C com luz

fluorescente. Após este período, as amostras foram novamente aquecidas em banho-maria fervente por 15 min ou até atingir temperatura interna de 75 ± 5 °C. As amostras foram resfriadas até atingirem a temperatura ambiente e a oxidação lipídica foi medida em triplicata conforme descrito no item

4.2.8.4 Avaliação do ácido fítico e eritorbato de sódio na estabilidade oxidativa de mortadela

4.2.8.4.1 *Preparo da mortadela*

As matérias-primas e os aditivos utilizados para a elaboração das mortadelas estão descritos na Tabela 3. O ácido fítico purificado, o ácido fítico padrão e o eritorbato de sódio foram adicionados juntamente com os demais aditivos de cada formulação nas quantidades estabelecidas no DCCR (Tabela 4). As formulações de mortadela foram elaboradas utilizando 60 % de CMS de aves como limite máximo permitido neste produto (BRASIL, 2000).

O preparo da massa foi realizado em um *cutter* com capacidade de 30 kg. A massa foi considerada pronta quando atingido o aspecto de "liga". Para o embutimento, foi utilizada tripa artificial de calibre 70 mm. O cozimento foi realizado em estufa automática (modelo Unimatic 1000, marca Eller, Merano, Itália) em quatro etapas, sendo três de 30 min, a primeira a 50°C, a segunda a 60°C e a terceira a 70°C e na quarta etapa, a temperatura foi mantida a 80°C até a temperatura interna da mortadela atingir 74°C. A umidade relativa utilizada no cozimento foi de 95 %. Após o cozimento, foi realizado o choque térmico por 15 min com água a temperatura ambiente na própria estufa de cozimento.

4.2.8.4.2 *Delineamento Experimental*

Foram realizados dois Delineamentos Compostos Centrais Rotacionais (DCCR), cada um com duas variáveis independentes, três pontos centrais e quatro pontos axiais, totalizando 11 ensaios em cada delineamento. Os níveis das variáveis independentes

X_E (eritorbato de sódio), X_P (ácido fítico padrão) e X_F (ácido fítico purificado) foram selecionados com base na Portaria n.1004 de 11 de dezembro de 1998 (BRASIL, 1998). Os ensaios para elaboração das mortadelas foram realizados aleatoriamente e posteriormente, mantidas a 30 °C em estufa tipo BOD (modelo TE-391, marca TECNAL, São Paulo, Brasil) por 30 dias. As amostras foram avaliadas em triplicata quanto a oxidação lipídica (item 4.2.8.2). A Tabela 4 apresenta a matriz do DCCR e a Tabela 5 apresenta as variáveis independentes, X_E (eritorbato de sódio), X_P (ácido fítico padrão), X_F (ácido fítico purificado) e os níveis de variação. Os modelos propostos para os delineamentos foram expressos conforme a Equação 4 e Equação 5.

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_E x_E + \beta_D x_D + \beta_{EE} x_E^2 + \beta_{DD} x_D^2 + \beta_{ED} x_E x_D + e \quad \text{Equação 4}$$

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_E x_E + \beta_F x_F + \beta_{EE} x_E^2 + \beta_{FF} x_F^2 + \beta_{EF} x_E x_F + e \quad \text{Equação 5}$$

onde:

\hat{y} = função-resposta

x_E, x_P e x_F = variáveis codificadas

β 's = coeficientes estimados pelo modelo de superfície de resposta

e = resíduo (erro experimental)

Tabela 3 – Matérias-primas e aditivos para elaboração de mortadela de frango

Matérias-primas e ingredientes	g.100 g ⁻¹ de mortadela de frango
CMS de frango	60,00
Retalhos de coxa e sobrecoxa de frango	10,00
Pele de frango	10,00
Gelo	10,43
Fécula de mandioca	3,00
Proteína texturizada de soja em pó (PTS)	4,00
Sal	1,80
Condimentos	0,52
Nitrato/nitrito de sódio	0,25

Tabela 4 – Matriz dos ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) com as variáveis independentes

Ensaio	Codificado	
	Eritorbato de sódio	Ácido fítico padrão ou purificado do farelo do arroz
	x_E	x_P ou x_F
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,414	0
6	1,414	0
7	0	-1,414
8	0	1,414
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Tabela 5 – Variáveis e níveis de variação

Variáveis	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
X_E - Eritorbato de sódio (mmol.L ⁻¹)	0	7,5	25,0	42,5	50,0
X_P - Ácido fítico padrão ou X_F - ácido fítico purificado (mmol.L ⁻¹)	0	1,5	5,0	8,5	10,0

4.2.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos nas etapas de extração do ácido fítico do farelo de arroz foram analisados estatisticamente pelo uso do programa STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2004).

Para análise estatística por ANOVA das etapas de purificação foi utilizado o mesmo programa seguido pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM) e considerado significativamente diferente quando $p < 0,05$.

Para avaliar a influência do tempo no método de BPS os dados foram estatisticamente analisados utilizando-se a ANOVA de uma via seguido do teste-t de comparações múltiplas de Bonferroni (Programa GraphPad Prism[®], Versão 4.00, 2003). As concentrações de ácido fítico padrão ou purificado para inibir o processo oxidativo em 50 % (IC50) foi estimada pelo mesmo software utilizando uma curva hiperbólica. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) e considerado significativamente diferente quando foi obtido $p < 0,05$.

Para avaliação do ácido fítico purificado do farelo de arroz como antioxidante em CMS foi utilizado a ANOVA de uma via seguido do teste-t de comparações múltiplas de Bonferroni (Programa GraphPad Prism, Versão 4.00, 2003). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e considerado significativamente diferente quando $p < 0,05$. Foi utilizado o *software* STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2004) para análise de regressão e variância e curvas de contorno utilizando o DCCR para a mortadela. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e considerado significativamente diferente quando $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

ANTONINI, E. Interrelationship between structure and function in hemoglobin and myoglobin. **Physiological Reviews**, v.45, p.123-170, 1965.

AOAC. **Official methods of analysis of association of official analytical chemists**. 18.ed. Maryland, United States: Association of Official Analytical Chemists, 2005.

BACON, B. R.; BRITTON, R. S. The pathology of hepatic iron overload: a free radical-mediated process? **Hepatology**, v.11, p.127-137, 1990.

BLANK, G. E.; PLETCHER, J.; SAX, M. The structure of myo-inositol hexaphosphate dodecasodium salt octatriacontahydrate: a single crystal X-ray analysis. **Biochemistry Biophysical Community**, v.44, p.319-325, 1971.

BODE, A. M.; DONG, Z. Signal transduction pathways: targets for chemoprevention of skin cancer. **The Lancet Oncology**, v.1, p.181-188, 2000.

BOLANM, B. J.; ULVIK, R. J. Release of iron from ferritin by xanthine oxidase. Role of the superoxide radical. **Biochemical Journal**, v.243, p.55-59, 1987.

BOS, K. D.; VERBEEK, C.; VANEEDEN, C. H. P.; SLUMP, P.; WOLTERS, P. Improved determination of phytate by ion-exchange chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.1770-1772, 1991.

BRASIL (1998). **Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998, que aprova o Regulamento Técnico: "Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos"**, constante do Anexo desta Portaria. Publicada no Diário Oficial da União em 14 de dezembro de 1998.

BRASIL (2000). **Instrução Normativa n. 4, de 31 de março de 2000, que aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha**. Publicada no Diário Oficial da União em 05 de abril de 2000.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI JR., W.; BORIN, M. F.; LOPEZ, R. F. V.; FONSECA, M. J. V. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v.328, p.183-190, 2007.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A., JR.; JABOR, J. R.; SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. V. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. **AAPS PharmSciTech**, v.7, (<http://aapspharmscitech.org>), 2006.

CHAMPAGNE, E. T.; PHILLIPPY, B. Q. Effects of pH on calcium, zinc, and phytate solubilities and complexes following in vitro digestions of soy protein isolate. **Journal of Food Science**, v.54, n.3, p.587-592, 1989.

CHEN, P. S.; TORIBARA, T. Y.; WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. **Analytical Chemistry**, v.28, p.1756-1758, 1956.

CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.13, p.297-335, 1980.

COSGROVE, D. J. The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. **Pure and Applied Chemistry**, v.16, p.209-224, 1966.

COSTELLO, A. J.; GLONEK, T.; MYRES, T. C. ³¹P nuclear magnetic resonance-pH titrations of myo-inositol hexaphosphate. **Carbohydrate Research**, v.46, n.2, p.159-171, 1976.

CRACKEL, R. L.; GRAY, J. I.; BOOREN, A. M.; BUCKELY, D. J. Effect of antioxidants on lipid stability in restructured beef steaks. **Journal of Food Science**, v.53, n.2, p.656-657, 1988.

CROSLAND, A. R.; PATTERSON, R. L. S.; HIGMAN, R. C.; STEWART, C. A.; HARGIN, K. D. Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat product - I: Chemical composition. **Meat Science**, v.40, n.3, p.289-302, 1995.

DEAN, J. A. **Flame Photometry**. New York: McGraw-Hill, 1960.

ELLIS, R.; MORRIS, E. R. Appropriate resin selection for rapid phytate analysis by ion-exchange chromatography. **Cereal Chemistry**, v.63, n.1, p.58-59, 1986.

EMPSON, K. L.; LABUZA, T. P.; GRAF, E. Phytic acid as a food antioxidant. **Journal of Food Science**, v.56, n.2, p.560-563, 1991.

ERDMAN, J. W. Oilseed phytates: nutritional implications. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.56, n.8, p.736-741, 1987.

FEBLES, C. I.; ARIAS, A.; HARDISSON, A.; RODRIGUEZ-ALVAREZ, C., SIERRA, A. Phytic acid level in wheat flours. **Food Chemistry**, v.74, n.4, p.437-441, 2001.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FIELD, R. A. Mechanically separated meat, poultry and fish. In: PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. **Edible meat by-products: Advances in meat research**. New York: Elsevier Applied Science, v.5, 1988.

FILGUEIRAS, C. T. **Purificação do ácido fítico do germe de milho e avaliação da propriedade antioxidante**. 2009. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR, Brasil.

FILGUEIRAS, C. T.; CASAGRANDE, R.; SOARES, A. L., SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E. I. Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho. **Química Nova**, v.32, n.7, p.1787-1791, 2009.

FORBES, R. M.; PARKER, H. M.; ERDMAN, J. W. Effects of dietary phytate, calcium and magnesium levels on zinc bioavailability to rats. **Journal of Nutrition**, v.114, n.8, p.1421-1425, 1984.

FOX, C. H.; EBERL, M. Phytic acid (IP6), novel broad spectrum anti-neoplastic agent: a systematic review. **Complementary Therapies in Medicine**, v.10, n.4, p.229-234, 2002.

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

FRONING, G. W.; MCKEE, S. R. Mechanical separation of poultry meat and its use in products. In: SAMS, A. R. **Poultry meat processing**. Boca Raton: CRC Press, 2001.
FUH, W. S.; CHIANG, B. H. Dephytinisation of rice bran and manufacturing a new food ingredient. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, n.15, p.1419-1425, 2001.

GOMES, H. A.; SILVA, E. N.; CARDELLO, H. M. A. B.; AVELAR, K. M. V.; CIPOLLI, B. Effect of gamma radiation on refrigerated mechanically deboned chicken meat quality. **Meat Science**, v.65, p.919-926, 2003a.

GOMES, H. A.; SILVA, E. N.; NASCIMENTO, M. R. L.; FUKUMA, H. T. Evaluation of the 2-thiobarbituric acid method for the measurement of lipid oxidation in mechanically deboned gamma irradiated chicken meat. **Food Chemistry**, v.80, p.433-437, 2003b.

GRAF, E. Applications of phytic acid. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.60, n.11, p.1861-1867, 1983.

GRAF, E.; EATON, J. W. Dietary suppression of colonic cancer: fiber or phytate? **Cancer**, v.56, n.15, p.717-718, 1985.

GRAF, E.; EATON, J. W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v.8, n.1, p.61-69, 1990.

GRAF, E.; EMPSON, K. L.; EATON, J. W. Phytic acid. A natural antioxidant. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.24, p.11647-11650, 1987.

GRAF, E.; MAHONEY, JR.; BRYANT, R. G.; EATON, J. W. Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.259, n.6, p.3620-3624, 1984.

GRAY, J. I.; GOMAA, E. A.; BUCKLEY, D. J. Oxidative quality and shelf life of meats. **Meat Science**, v.43, p.S111-S123, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.; ARUOMA, O. I. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical Biochemistry**, v.165, n.1, p.215-219, 1987.

HAN, Y. W. Removal of phytic acid from soybean and cottonseed meals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, n.6, p.1181-1183, 1988.

HARBACH, A. P. R.; COSTA, M. C. R.; SOARES, A. L.; BRIDI, A. M.; SHIMOKOMAKI, M.; SILVA, C. A.; IDA, E. I. Dietary corn germ containing phytic acid prevents pork meat lipid oxidation while maintaining normal animal growth performance. **Food Chemistry**, v.100, n.4, p.1630-1633, 2007.

HARLAND, B. F.; OBERLEAS, D. Phytate in foods. **World Review of Nutrition Dietetics**, v.52, p.235-259, 1987.

HASLER, C. M.; KUNDRAT, S.; WOOL, D. Functional foods and cardiovascular disease. **Current Atherosclerosis Report**, v.2, p.467-475, 2000.

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

HIX, D. K.; KLOPFENSTEIN, C. F.; WALKER, C. E. Physical and chemical attributes and consumer acceptance of sugar-snap cookies containing naturally occurring antioxidants. **Cereal Chemistry**, v.74, n.3, p.281-283, 1997.

HUANG, D.; Ou, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

HURREL, R. F. Phytic acid degradation as a means of improving iron absorption. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.74, n.6, p.445-452, 2004.

IGENE, J. O.; PEARSON, A. M. Role of phospholipids and triglycerides in warmed-over flavor development in meat model systems. **Journal of Food Science**, v.44, n.5, p.1285-1290, 1979.

IUPAC - IUB. The nomenclature of cyclitols. **European Journal of Biochemistry**, v.5, p.1, 1968.

JENAB, M.; THOMPSON, L. U. Phytic acid in wheat bran affects colon morphology, cell differentiation and apoptosis. **Carcinogenesis**, v.21, n.8, p.1547-1552, 2000.

JENAB, M.; THOMPSON, L. U. Role of phytic acid in cancer and other Diseases. In: REDDY, N. R.; SATHE, S. K. **Food Phytates**, Florida: CRC Press, 2002, p.25-51.

JOHNSON, L. F.; TATE, M. E. Structure of "phytic acids". **Canadian Journal of Chemistry**, v.47, n.1, p. 63-73, 1969.

KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. **Food Chemistry**, v.100, p.451-458, 2007.

KASIM, A. B.; EDWARDS JR, H. The analysis for inositol phosphate forms in feed ingredients. **Journal of Food Science and Agriculture**, v.76, p.1-9, 1998.

KIMURA, G.; KAMAMURA, NODA; E., ZUSHI, H., TAKEUCHI, H., YOKOHAMA, TSUKUSHIRO, K. **Process for producing phytic acid**. United States Patent. N.3591665, 1971.

KOLCHEV, L. A. **Method for producing phytin.** United States Patent. N.4070422, 1978.

LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.28, n.6, p.1313-1315, 1980.

LEE, Y.; HARGUS, G.; KIRKPATRICK, D.; BERNER, D.; FORSYTHE, R. Mechanism of lipid oxidation in mechanically deboned chicken meat. **Journal of Food Science**, v.40, n.5, p.964-967, 1975.

LEE, B. J.; HENDRICKS, D. G. Phytic acid protective effect beef round muscle lipid peroxidation. **Journal of Food Science**, v.60, n.2, p.1313-1315. 1995.

LEE, B.; HENDRICKS, D. G.; CONFORTH, D. P. Antioxidant effects of carnosine and phytic acid in a model beef system. **Journal of Food Science**, v.63, p.394-398, 1998.

LEE, S. H.; PARK, H. J.; CHUN, H. K.; CHO, S. Y.; CHO, S. M.; LILLEHOJ, H. S. Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice. **Nutrition Research**, v.26, p.474-479, 2006.

LIU, R. H. Protective role of phytochemicals in whole foods: implications for chronic disease prevention. **Applied Biotechnology, Food Science and Policy**, v.1, p.39-46, 2003.

LIU, Z.; CHENG, F.; ZHANG, G. Grain phytic acid content in japonica rice as affected by cultivar and environment and its relation to protein content. **Food Chemistry**, v.89, p.49-52.

LOLAS, G. M.; PALAMIDIS, N.; MARKAKIS, P. The phytic acid - total phosphorus. Relationship in barley, oats, soybeans and wheat. **Cereal Chemistry**, v.53, n.6, p.867-871, 1976.

LOPEZ, H. W.; LEENHARDT, F.; COUDRAY, C.; REMESY, C. Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition? **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p.727-739, 2002.

LOTT, J. N. A.; OCKENDEN, I.; RABOY, V.; BATTEN, G. D. A global estimate of phytic acid and phosphorus in crop grains, seeds, and fruits. In: REDDY, N. R., SATHE, S. K. **Food Phytates**, Florida: CRC Press, 2002.

- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
- LYNCH, M. P.; KERRY, J. P.; BUCKLEY, D. J.; FAUSTMAN, C.; MORRISSEY, P. A. Effect of dietary vitamin E supplementation on the colour and lipid stability of fresh, frozen and vacuum-packaged beef. **Meat Science**, v.52, n.1, p.95-99, 1999.
- MAGA J. A. Phytate; its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance and methods of analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.30, n.1, p.1-9, 1982.
- MAKOWER, R. U. Extraction and determination of phytic acid in beans (*Phaseolus vulgaris*). **Cereal Chemistry**, v.47, p.288-295, 1970.
- MANCINI-FILHO, J.; PASSOTTO, J. A.; PENTEADO, M. V. C. Atividade antioxidante do beta-caroteno e da vitamina A. Estudo comparativo com antioxidante sintético. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, p.68-72, 1998.
- MESSINA, M. Phytate's potencial role in reducing colon-cancer risk. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.54, n.3/4, p.762, 1991.
- MIELNIK, M. B.; AABY, K.; SKREDE, G. Commercial antioxidants control lipid oxidation in mechanically deboned turkey meat. **Meat Science**, v.65, p.1147-1155, 2003.
- MORRIS, E. R.; HILL, A. D. Inositol phosphate content of selected dry beans, peas, and lentils, raw and cooked. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.9, p.2-12, 1996.
- MORRISSEY, P. A.; SHEEHY, P. J. A.; GALVIN, K.; KERRY, J. P.; BUCKLEY, D. J. Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, v.49, p.S73-S86, 1998.
- NEGRÃO, C. C.; MIZUBUTI, I. Y.; MORITA, M. C., COLLI, C., IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein quality. **Food Chemistry**, v.90, p.579-583, 2005.
- NORAZALINA, S.; NORHAIZAN, M. E.; HAIRUSZAH, I.; NORASHAREENA, M. S. Anticarcinogenic efficacy of phytic acid extracted from rice bran on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.62, n.3, p.259-268, 2009.

O'DELL, B. L.; DeBOLAND, A. Complexation of phytate with proteins and cations in corn germ and oilseed meals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.24, p.804-808, 1976.

O'DELL, B. L.; DeBOLAND, A.; KOIRTYOHANN, S. R. Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.20, p.718-721, 1972.

OBERLEAS, D. Phytates. In: **Toxicants occurring naturally in foods**. Washington: National Academy of Sciences, 1973.

OLIVO, R. Alterações oxidativas em produtos cárneos. In: SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N. N.; FRANCO, B. D. G. M. **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. São Paulo: Varela, 2006.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Fatores que influenciam as características das matérias-primas e suas implicações tecnológicas. In: SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N. N.; FRANCO, B. D. G. M. **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. São Paulo: Varela, 2006.

PARK, H. R.; AHN, H. J.; KIM, S. H.; LEE, C. H.; BYUN, M. W.; LEE, G. W. Determination of the phytic acid levels in infant foods using different analytical methods. **Food Control**, v.17, p.727-732, 2006.

PERSSON, H.; TURK, M.; NYMAN, M.; SANDBERG, A. S. Binding of Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Cd^{2+} to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3194-3200, 1998.

PETERSON, D. M. Oat antioxidants. **Journal of Cereal Science**, v.33, p.115-129, 2001.

POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food - Practical applications**, Cambridge: CRC Press, 2001.

PRATTLEY, C. A.; STANLEY, D. W. Protein-phytate interactions in soybeans. I. Localization of phytate in protein bodies and globoids. **Journal of Food Biochemistry**, v.6, p.243-254, 1983.

RANKEN, M. D. **Handbook of meat product technology**, London: Blackwell Science Ltd., 2000.

REDDY, N. R. Occurrence, Distribution, Content, and Dietary Intake of Phytate. In: REDDY, N. R.; SATHE, S. K. **Food Phytates**, Florida: CRC Press, 2002.

RIZVI, I.; RIGGS, D. R.; JACKSON, B. J.; NG, A.; CUNNINGHAM, C.; McFADDEN, D. W. Inositol hexaphosphate (IP₆) inhibits cellular proliferation in melanoma. **Journal of Surgical Research**, v. 133, p.3-6, 2006.

ROSSINI, K.; NOREÑA, C. P. Z.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. **Food Science and Technology**, v.42, p.862-867, 2009.

SADAT, T.; VOLLE, C. Integration of a linear accelerator into a production line of mechanically deboned separated poultry meat. **Radiation Physics and Chemistry**, v.57, p.613-617, 2000.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I.; JIMÉNEZ - ESCRIG, A.; SAURA - CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, v.90, p.133-139, 2005.

SAW, N. K.; CHOW, K.; RAO, P. N.; KAVANAGH, J. P. Effects of inositol hexaphosphate (Phytate) on calcium binding, calcium oxalate crystallization and in vitro stone growth. **The Journal of Urology**, v.177, p.2366-2370, 2007.

SHAHIDI, F.; RUBIN, L. J.; DIOSADY, L. L.; WOOD, D. F. Effect of sulphanilamide on the TBA values of cured meats. **Journal Food Science**, v.50, p.274-275, 1985.

SHAMSUDDIN, A. Anti-cancer function of phytic acid. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p.769-782, 2002.

SHAMSUDDIN, A. M.; VUCENIK, I. Mammary tumor inhibits large intestinal cancer in F344 rats 5 months after induction by azoxymethane. **Carcinogenesis**, v.10, p.625-626, 1999.

SHAMSUDDIN, A. M.; VUCENIK, I.; COLE, K. E. IP₆: A novel anti-cancer agent. **Life Science**, v.61, p.343-354, 1997.

SHIMOKOMAKI, M.; SOARES, A. L.; IDA, E. I.; OLIVO, R. Synergism between dietary vitamin E and exogenous phytic acid in prevention of warmed-over flavor in chicken Pectoralis major. In: **Proceedings of the 1999 IFT Annual Meeting**. Chicago: IFT, p.184, 1999.

SHIMOKOMAKI, M.; ODA, S. H. I.; SOARES, A. L.; LARA, J. A. F.; YAMASHITA, F.; IDA, E. I. Segurança e Qualidade para os embutidos. **Revista Nacional da Carne**, n.317, 2003.

SILVA, M. A.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. **Journal of Food Engineering**, v.75, p.487-491, 2006.

SOARES, A. L. **Ação de ácido fítico e vitamina E na oxidação lipídica e aroma de requentado em filés de peito de frango**. 1998. Dissertação (Mestrado em Ciência em Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR - Brasil.

SOARES, A. L.; OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E. I. Synergism between dietary vitamin E and exogenous phytic acid in prevention of warmed-over flavour development in chicken breast meat, Pectoralis major M. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.1, p.57-62, 2004.

SOUSA, R. A.; SILVA, J. C. J.; BACCAN, N.; CADORA, S. Determination of metals in bottled coconut water using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p.399-408, 2005.

STATSOFT Inc. (2004). **STATISTICA** (data analysis software system), version 7. Tulsa, Oklahoma, USA.

STEER, T. E.; GIBSON, G. R. The microbiology of phytic acid metabolism by gut bacteria and relevance for bowel cancer. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p.783-790, 2002.

STODOLAK, B.; STARZYNSKA, A.; CZYSZCZON, M.; ZYLA, K. The effect of phytic acid on antioxidant stability of raw and cooked meat. **Food Chemistry**, v.101, p.1041-1045, 2007.

TARLADGIS, B. G.; PEARSON, A. M.; DUGAN, L. R. Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods - II. Formation of the TBA-malonaldehyde complex without acid-heat treatment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.15, p.602-604, 1964.

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

TERRA, N.; TERRA, A.; TERRA, L. **Defeitos nos produtos cárneos: origens e soluções.** São Paulo: Varela, 2004.

THOMPSON, D. B.; ERDMAN JR, J. W. Phytic Acid in Soybeans. **Journal of Food Science**, v.47, p.513-517, 1982.

THOMAS, M. J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition**, v.16, n.7/8, p.16-18, 2000.

TUBOLY, E.; LEOVICS, V. K.; GAÁL, O.; MÉSZÁROS, L.; FARKAS, J. Microbiological and lipid oxidation studies on mechanically deboned turkey meat treated by high hydrostatic pressure. **Journal of Food Engineering**, v.56, p.241-244, 2003.

VERGHESE, M.; RAO, D. R., CHAWAN, C. B., WALKER, L. T., SHACKELFORD, L. Anticarcinogenic effect of phytic acid (IP6): Apoptosis as a possible mechanism of action. **Food Science and Technology**, v.39, p.1093-1098, 2006.

VHORA, P.; GRAY, G. A.; KRATZER, F. H. Phytic acid-metal complexes. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v.120, p.447-449, 1965.

VUCENIK, I.; ZHANG, Z. S.; SHAMSUDDIN, A. M. IP6 in treatment of liver cancer. II. Intra-tumoral injection of IP6 regresses pre-existing human liver cancer xenotransplanted in nude mice. **Anticancer Research**, v.18, p.4091-4096, 1998.

VUCENIK, I.; PASSANITI, A.; VITOLO, M. I.; TANTIVEJKUL, K.; EGGLETON, P.; SHAMSUDDIN, A. Anti-angiogenic activity of inositol hexaphosphate (IP6). **Carcinogenesis**, v.25, p.2115-2123, 2004.

VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN, A. M. Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. **Nutrition and Cancer**, v.55, p.109-125, 2006.

XU, Q.; KANTHASAMY, A. G.; REDDY, M. B. Neuroprotective effect of the natural iron chelator, phytic acid in a cell culture model of Parkinson's disease. **Toxicology**, v.245, p.101-108, 2008.

ZANARDI, E.; DORIGONI, V.; BADIANI, A.; CHIZZOLINI, R. Lipid and colour stability of Milano-type sausages: effect of packing condition. **Meat Science**, v.61, p.7.14, 2002.

WALLACE, W. J.; HOUTCHENS, R. A.; MAXWELL, J. C.; CAUGHEY, W. S. Mechanism of autoxidation for hemoglobins and myoglobin. **The Journal of Biology Chemistry**, v.257, p.4966-4977, 1982.

WEINBERG, E. D. Association of iron with colorectal cancer. **BioMetals**, v.7, p.211-216, 1994.

WHEELER, E. L.; FERREL, R. E. A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. **Cereal Chemistry**, v.48, p.312-320, 1971.

WINDISCH, W. Interaction of chemical species with biological regulation of the metabolism of essential trace elements. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.372, p.421-425, 2002.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão redigidos na forma de três artigos científicos e de resumos apresentados em eventos científicos e de iniciação científica, conforme segue.

5.1 Artigo Científico 1: Extraction and Purification Techniques for Rice Bran Phytic Acid. Submetido ao Journal of Food Composition and Analysis. As normas para publicação estão anexadas após o artigo.

Extraction and Purification Techniques for Rice Bran Phytic Acid

Cristiane Canan¹, Felipe Tsuruta Lisboa Cruz¹, Fernanda Delarozza¹, Rubia Casagrande²,
Cleonice Pereira Mendes Sarmiento³, Massami Shimokomaki¹, Elza Iouko Ida^{1*}

¹Londrina State University, Department of Food Science and Technology, Londrina, Paraná, Brazil

²Londrina State University, Department of Pharmaceutical Sciences, Londrina, Paraná, Brazil

³Federal Technological University of Paraná, Campus Medianeira, Department of Food Technology, Medianeira, Paraná, Brazil

* Corresponding author. Fax: +55 43 3371-4080.

Email address: elida@uel.br (Dr Elza Iouko Ida)

Abstract

The objective of this work was to develop rice bran IRGA 417 phytic acid (PA) extraction and purification techniques. For the extraction of PA, a complete 2^4 factorial design with triplicates at the central point was used, and the effects of concentration of rice bran and HCl, time and temperature were investigated. During purification, different pH values were tested with addition of $1.5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ or $4.0 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaOH}$. The results showed that temperature, time and HCl concentration influenced the PA extraction technique significantly ($p < 0.05$), whereas the concentration of rice bran had no influence. The content of PA was evaluated in all the stages of purification and it was possible to establish a new efficient methodology of extraction and purification with high purity and yields.

Keywords: Myo-inositol hexaphosphate. Cereals. Response surface methodology. Analytical process. Antioxidants.

1 Introduction

Phytic acid (PA) or myo-inositol hexaphosphate is a strong chelator of multivalent metal ions, especially iron, zinc and calcium (Hurrell, 2004). For many years, PA was considered an anti-nutritional compound because it reduces the bioavailability of several minerals important for human nutrition (Bohn et al., 2007; Li et al., 2008). However, since the 1990s, PA has been scientifically emphasized for its beneficial effects on human health, particularly in the prevention of diabetes (Lee et al., 2006), renal calculi (Saw et al., 2007), Parkinson's disease (Xu et al., 2008) and cancer (Vucenik and Shamsuddin, 2006). The application of 0.50% PA acid rice bran added to the drinking water after tumor induction, reduced the risk of colon cancer in rats (Norazalina et al., 2009). Its antioxidant effect, described by several researchers (Lee and Hendricks, 1995; Soares et al., 2004; Stodolak et al., 2007; Harbach et al., 2007), is due to its ability to inhibit the formation of hydroxyl radicals ($\cdot\text{HO}$) and to form chelates with Fe^{2+} ions, causing them to become catalytically inactive (Graf and Eaton, 1990).

PA also significantly inhibits the development of warmed over flavor (WOF) in beef (Lee et al., 1998) and chicken meat (Shimokomaki et al., 1999). It prevents lipid oxidation in a synergic manner, as measured in chicken meat, while the birds received vitamin E in their diets (Soares et al., 2004). Recently, our laboratory demonstrated that PA prevented rancidity in meat without endangering health when administered in a pig's diet (Harbach et al., 2007). In addition, the antioxidant property of PA obtained from corn germ was also assessed, and its potential antioxidant role was confirmed through deoxyribose and bathophenanthroline tests (Filgueiras et al., 2009).

PA is distributed in the different rice components, primarily concentrated in the germ with $7.6 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ and endosperm with $1.2 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (O'Dell et al., 1972). Rice bran, consisting of pericarp, aleurone and germ, has a high concentration of PA ranging from 5.94 to $6.09 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (Kasim and Edwards JR., 1998). However the PA content ranges depending

on the local rice cultivation conditions (Liu et al., 2005). Rice bran is considered a rice industry by-product and corresponds to 10 g.100 g⁻¹ of integral rice grain. It is used for oil extraction, feed production and also as an ingredient in the formulation of food products because of its protein, lipid, mineral and antioxidant contents (Parrado et al., 2006).

Rice bran is a byproduct of rice industry and produced on a large scale, with high levels of PA that presents antioxidant capacity and potential beneficial effects on health. Therefore, this work aims at describing an analytical technique for the efficient extraction and purification of PA using rice bran as a model system.

2 Materials and Methods

2.1. Materials and reagents

IRGA 417 cultivar raw rice bran was kindly donated by the Rio Grande Rice Institute (IRGA), Cachoeirinha/Rio Grande do Sul, Brazil, harvest 2007/2008. Dodecasodium phytate from rice (P0109/Sigma, St. Louis, USA) was used as a standard and all chemicals used were of analytical grade.

2.2. PA determination

PA was extracted with 0.8 mol.L⁻¹ HCl at a concentration of 0.1 g.mL⁻¹ and quantified according to the procedure described by Latta and Eskin (1980) based on the reaction between ferric ion and sulfosalicylic acid with modification of the resin to Dowex-AGX-4, as proposed by Ellis and Morris (1986). The result was expressed as g of PA in 100 g of sample or 100 mL of extract.

2.3. Experimental design for extraction of PA from rice bran

To investigate the technique of PA extraction, the following independent variables were selected: X₁ (rice bran concentration, g.mL⁻¹), X₂ (hydrochloric acid concentration, M),

X_3 (temperature, °C) and X_4 (time, h), with three levels of variation (-1, 0, +1). Table 1 shows the matrix of the experimental design (2^4) with the levels of variation and the dependent variable or Y (experimental response) and the \hat{Y} (estimated response), expressed as g of PA extracted in 100 g of rice bran, on a dry basis. The assays were carried out at random. The software STATISTICA 7.0 was used for regression analysis and to create a surface response model. The model is expressed as Equation 1:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{14} x_1 x_4 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{24} x_2 x_4 + \beta_{34} x_3 x_4 + e \quad \text{Equation 1}$$

where

Y = response,

x_1, x_2, x_3 and x_4 = coded variables,

β = estimated coefficients in the response surface model,

e = residual (experimental error).

After examining the response surface was conducted in triplicate assays under the conditions of maximum extraction to experimental validation of the proposed model.

2.4. Development of the PA purification technique

An analytical procedure for the purification of PA (Figure 1) was developed after establishing the conditions according to experimental design (item 2.3) of extraction for 1 h at 25°C (shaker model MA 830/A, Marconi, São Paulo, Brazil) with 1.0 mol.L⁻¹ HCl and a concentration of rice bran of 0.1 g.mL⁻¹. The pH of the extract containing PA was adjusted to 4.5 with a solution of 4 mol.L⁻¹ NaOH, the rice protein's isoelectric point (Gupta et al. 2008), and the extract was centrifuged at 2000 x g for 10 min. (model BR4i, Jouan, Saint Herblain, France). A supernatant (S_1) and pellet (P_1) were obtained.

Effect of pH on PA precipitation

In S_1 , the best pH conditions for precipitating and reducing the losses of PA were found with a solution of $1.5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ or $4 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaOH}$ and varying the pH value from 7.0 to 9.0 in increments of 0.5. After adjusting the pH of the respective supernatant S_1 , the solution was stored for an additional 12 h. The formed pellets were recovered by centrifugation, as discussed above, and the supernatants were discarded. Ten pellets (P_2) were obtained: 5 from the precipitation with $1.5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ and 5 from the precipitation with $4 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaOH}$. The P_2 pellets containing PA were resuspended with $1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ HCl}$, 10 mL of formaldehyde and 0.5 g of diatomaceous earth to denature the proteins and remove other contaminants. The suspensions were shaken for 2 h at ambient temperature in a hood, kept at rest for an additional 12 h and filtered through qualitative filter paper Whatman # 3. In the filtered solution (S_3) the best pH condition for PA precipitation was found with a $1.5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ solution and varying the pH value from 7.0 to 9.0 in increments of 0.5. After adjusting the pH of S_3 , the pellet formed (P_4) was recovered through qualitative filter paper Whatman # 3, and the filtered solution was discarded. All of the recovered PA precipitates were dried for 24 h in an oven at 60°C and the content and yield of the purified PA were determined.

2.5. Purified phytate yield

The content of PA was determined according to the item 2.2. The yield was expressed as a percentage and calculated as the ratio of the initial rice bran PA content (PA_i) to the obtained PA content (PA_c), multiplied by 100.

2.6. Process evaluation of PA purification Content of organic, inorganic and total phosphorus

The extraction and digestion of organic phosphorus, P, from the PA standard and the rice bran were performed according to the method described by Thompson and Erdman (1982) and colorimetrically determined according to Chen et al. (1956). The inorganic P was analyzed from the supernatant obtained after PA extraction and quantified in the same manner as the total P: by optical emission spectrometry with an inductively coupled plasma source (ICP-OES) (model Optima 3000 DV, Perkin Elmer), according to Sousa et al. (2005).

Soluble protein, total nitrogen and total protein contents

The quantification of the soluble protein in the PA standard and the purified PA was conducted according to Lowry et al. (1951). The quantification of the total nitrogen and the total protein (factor 6.25) was performed according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005).

Mineral contents

The quantification of Cu, Zn, Ni, Co, Mn, Fe, Ca and Mg in the standard and the purified PA was carried out in the ICP-OES, (model Optima 3000 DV, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) according to Sousa et al. (2005). The content of Na and K was determined with a flame photometer (model B462, Micronal, São Paulo, Brazil), according to Dean (1960).

Solubility

The purified rice bran PA solubility was investigated at pH 4.0, 6.0 and 8.0 in disodium phosphate and a citric acid buffer. For each pH value, purified PA in a saturated acid solution was prepared and shaken for 12 h, followed by filtration through filter paper

Whatman # 3 according to Casagrande et al. (2007). PA was quantified in the filtrates according method of item 2.2.

2.7. Statistical analysis

The statistical analysis (ANOVA) was carried out using the program STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc. Corporate Tulsa, OK, EUA) (Statsoft, 2004) followed by Tukey test. The results were expressed as the mean \pm standard deviation (SDM) and considered significantly different at $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. PA extraction technique

Tables 1, 2 and 3 present the effects of the variables and the response estimated by the model (Y) for the IRGA 417 rice bran PA extraction. According to the regression coefficients (Table 2), the variables X_2 (concentration of HCl), X_3 (temperature) and X_4 (time) had a significant effect on the response (Y). These results were similar to those for soya PA extraction reported by Han (1988) and for extruded cotton and rice bran by Fuh and Chiang (2001). According to Kolchev (1978) the important variables for the production of rice bran phytin were a solid/liquid ratio of 1:5, a concentration of 0.1 mol.L^{-1} HCl and an extraction time of 2 h. There are few descriptions in the literature of the extraction of PA from grains for the purpose of purification, although many studies have been performed on extracting and quantifying the amount of PA.

For PA extraction in legumes and cereals, either water or an acid solvent is routinely used (Kolchev, 1978). Hydrochloric acid is most often employed in concentrations ranging from 0.01 to 2.4 mol.L^{-1} (Makower, 1970; Han, 1988; Park et al., 2006). Other acids have also been used in different concentrations such as phosphoric, acetic, sulfuric (Han, 1988), perchloric (Makower, 1970) and trichloroacetic acids (Uppstrom and Svensson, 1980).

According to Han (1988), there is no clear relationship between strong and weak acids in the extraction of PA in soy and cottonseed samples. For the extraction of PA from different raw materials, temperature is also considered an important factor. Various temperatures have been used: 20°C (Han, 1988; Fuh and Chiang, 2001), 8°C (Bohn et al., 2007) and 25 to 50°C (Han, 1988). In this investigation, the variable X_1 (rice bran concentration) and the interactions X_2X_4 and X_3X_4 showed no significant effects. Depending on the sample, the concentration of rice bran using the solid-liquid ratio (w/v) was also considered one of the factors. The following ratios have been used in the literature: 1:3 (Park et al., 2006), 1:10 (Bos et al., 1991), 1:15 (Makower, 1970), 1:20 (Latta and Eskin, 1980) and 1:25 (Uppstrom and Svensson, 1980).

The lowest level of PA was extracted under the following conditions: 0.2 mol.L⁻¹ HCl ($x_2 = -1$), temperature of 75°C ($x_3 = +1$) and extraction time of 3 h ($x_4 = +1$). The assays reproduced the proposed model as well as confirmed by the low relative standard error (0.48) for Tests 17, 18 and 19 (Table 1).

Taking into consideration the fact that the variance analysis and regression were significant (Tables 2 and 3), three mathematical models were developed using predictive variables coded for the significant responses X_2 , X_3 and X_4 . The model (Equation 2) that best represented the process of PA extraction contained only the significant variables, such as X_2 (concentration of HCl), X_3 (temperature) and the interaction between X_2 and X_3 . The nonsignificant parameters were incorporated into the residuals to calculate the analysis of variance (ANOVA) (Table 3).

$$Y = 4.97 + 0.48x_2 - 0.74x_3 - 0.28x_2x_3 \quad \text{Equation 2}$$

From the results, it was possible to construct the surface response (Figure 2), and the variables X_2 (concentration of HCl) and X_3 (temperature) were individually evaluated. As it

can be observed, there was an region for maximum extraction of rice bran PA in the region of 0.72 to 1.8 mol.L⁻¹ HCl (X₂) and for a temperature (X₃) of around 25°C.

Before validating the expected response of the predictive model, the extraction times (X₄) of PA of 30 and 45 min were tested in triplicate and compared with the extraction time of 1 h. We observed that the extraction time of 1 h differed significantly ($p < 0.05$) from the time of 30 and 45 min. The content of extracted PA in 100 g of rice bran on a dry basis for these three extraction times was 5.88 ± 0.09 , 4.55 ± 0.17 and 2.86 ± 0.14 g, respectively. Thus, it was determined that the maximum extraction of PA occurred when the minimum time was 1 h (X₄ = -1), a concentration of 1 mol.L⁻¹ HCl (x₂ = +1) was used, the concentration of rice bran was maintained of at 0.1 g.mL⁻¹ (x₁ = -1) and the temperature was 25°C (x₃ = -1). After confirming these conditions of maximum extraction of rice bran PA, an assay was performed in triplicate. The response (Y) was 6.48 g of extracted PA in 100 g of rice bran on a dry basis. Replacing X₂, X₃ and the X₂X₃ interaction in Equation 2, we obtained the expected response of 6.70 g of extracted PA in 100 g of rice bran on a dry basis. The predicted relative error of the model (Y) in relation to the PA content was 3.28%. These results confirm the validity of the predictive model and show that the data were properly adjusted to the experimental data.

3.2. Analytical procedures for PA purification

After validation of the predictive extraction method model, every step of the purifying analytical technique was verified, including the conditions in which they provided the maximum purity grade and the minimum loss (Figure 1). The effect of pH on precipitation was investigated, and the PA content was determined in the supernatant S₂ (Table 4) after adjusting the pH with solutions of 1.5 mol.L⁻¹ Na₂CO₃ or 4 mol.L⁻¹ NaOH. The minimum loss occurred when the pH of supernatant S₂ was adjusted with 1.5 mol.L⁻¹ Na₂CO₃ from 8.0 to 9.0 or with 4.0 mol.L⁻¹ NaOH from 8.5 to 9.0. The PA content did not differ among groups ($p > 0.05$) when 1.5 mol.L⁻¹ Na₂CO₃ or 4 mol.L⁻¹ NaOH was used to adjust the pH value to 9.0.

At this stage of the purification process, the lowest pH adjustment was chosen, pH 8.0 with $1.5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$, which did not change ($p > 0.05$) with a pH adjustment to 8.5. In his work on phytin preparation from rice bran and other wastes from food industries, Kolchev (1978) employed NaHCO_3 to adjust the pH of the acid extract to 7.0 and 8.0. Inorganic phosphorus (Na_2HPO_4) were discarded through precipitation because were formed the insoluble $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ and $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$.

In the step for precipitating PA in supernatant S_3 , only $1.5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ was used, as described in the previous step for adjusting the pH from 7.0 to 9.0 at 0.5 pH value intervals. After filtering with filter paper Whatman # 3 and drying the pellet in an oven at 60°C , a white powdery PA was obtained. The yield of purified PA (Table 5) at different pH values did not differ among groups ($p > 0.05$). The addition of $1.5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ decreased the purity grade because larger volumes of $1.5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ were used for the precipitation. The maximum degree of purity was obtained when the S_3 pH was adjusted to 7.0 or 7.5; these two values did not differ significantly ($p > 0.05$). In this purification step, the supernatant S_3 pH was adjusted to 7.0 using $1.5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ because of the possibility of lowering the number of impurities ($21.81 \pm 0.86\%$) present in the purified PA. The loss of PA during the analytical purification process was evaluated after identifying the pH adjustments of supernatants S_2 and S_3 with $1.5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ with the determination of PA in pellets P_1 and P_3 and supernatant S_2 and supernatant S_4 (Figure 1). The total loss of $1.42 \pm 0.03 \text{ g PA}$ in 100 g of rice bran represented a $26.88 \pm 0.52\%$ loss of PA, considering the content of an initial sample of $5.37 \pm 0.09 \text{ g of PA}$ in 100 g of rice bran. Therefore, it was confirmed that the technique of extraction and purification of PA was possible with a recovery of $72.88 \pm 0.98 \text{ g.100 g}^{-1}$ of rice bran, a purity of $78.19 \pm 0.86\%$ and a yield of $73.21 \pm 0.90\%$ (Table 5).

3.3. Evaluation of the analytical procedure for purification of PA in rice bran

The purified PA was characterized to evaluate the efficiency of the procedure (Table 6). The phytic P content of the standard PA was $124.86 \pm 2.78 \text{ mg.g}^{-1}$ and of the purified PA was $64.63 \pm 2.77 \text{ mg.g}^{-1}$, which corresponded to $94.12 \text{ g.100 g}^{-1}$ and $62.21 \text{ g.100 g}^{-1}$ of total P. The inorganic P content was $0.01 \pm 0.00 \text{ mg.g}^{-1}$ and $0.11 \pm 0.00 \text{ mg.g}^{-1}$ PA, respectively.

In the purified PA, the total nitrogen content was $0.15 \pm 0.00\%$, the soluble proteins were $0.60 \pm 0.01\%$ and the total protein was $0.94 \pm 0.00\%$. These values were considered low compared to the content of these components in rice bran, which protein content varies from 12.00 to 15.00% (Saunders, 1990), indicating that the protein separation by isoelectric precipitation in this particular process was efficient.

The purified PA showed higher or equal levels of other minerals when compared with the standard PA. The total content of minerals was $1.13 \text{ g.100 g}^{-1}$ in the standard PA and $3.90 \text{ g.100 g}^{-1}$ in the purified PA. Mg was the predominant mineral in the purified PA, with $58.31 \text{ g.100 g}^{-1}$ of total minerals. Sodium accounted for $97.63 \text{ g.100 g}^{-1}$ and $28.22 \text{ g.100 g}^{-1}$ of total minerals in the standard and the purified PA, respectively (Table 6). The presence of Na and Mg and other minerals such as K and Ca may indicate a tendency of these minerals to form their respective phytates (Persson et al., 1998).

The solubility of purified PA was observed at pH 4.0, 6.0 and 8.0 (Figure 3). It was significantly higher at pH 4.0 ($8.81 \pm 4.83 \text{ mg.mL}^{-1}$), while pH 6.0 and 8.0 (7.45 ± 0.88 and $6.44 \pm 0.41 \text{ mg.mL}^{-1}$) showed no significant difference ($p > 0.05$). The low solubility value of the purified PA at pH 6.0 or 8.0 was possibly due to the presence of other salts, particularly calcium phytates and carbonates associated with zinc and copper phytates, which have a lower solubility at a pH around 6.0 (Nolan et al., 1987). According to Graf et al. (1987), the solubility of PA in different pHs is important for its application as an antioxidant in foods because PA is an effective and nontoxic iron chelator.

4. Conclusions

It was possible to establish a new efficient methodology of extraction and purification of PA with high purity and yields. In the procedure for extracting rice bran PA, the temperature, the HCl concentration and the extraction time were significant ($p < 0.05$), while the concentration of rice bran ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) had no significant effect.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of CNPq-Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Process 473246/2007-4 and the IRGA-Rio Grande Rice Institute for the kind donation of rice bran. EII and MS are CNPq Research Fellows.

References

- AOAC (2005). *Official methods of analysis of association of official analytical chemists*. 18.ed. Maryland, United States: Association of Official Analytical Chemists.
- Bohn, L., Josefsen, L., Meyer, A. S., Rasmussen, S. (2007). Quantitative analysis of phytate globoids isolated from wheat bran and characterization of their sequential dephosphorylation by wheat phytase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7547-7552.
- Bos, K. D., Verbeek, C., Vaneeden, C. H. P., Slump, P. Wolters, P. (1991). Improved determination of phytate by ion-exchange chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1770-1772.
- Casagrande, R., Georgetti, S. R., Verri Jr., W., Borin, M. F., Lopez, R. F. V., Fonseca, M. J. V. (2007). In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical

formulations and its functional stability by antioxidant activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 328, 183-190.

Chen, P.S., Toribara, T.Y., Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Analytical Chemistry*, 28, 1756-1758.

Dean, J. A. (1960). *Flame Photometry*. New York: McGraw-Hill.

Ellis, R., Morris, E. R. (1986). Appropriate resin selection for rapid phytate analysis by ion-exchange chromatography. *Cereal Chemistry*, 63, 58-59.

Filgueiras, C. T., Casagrande, R., Soares, A. L., Shimokomaki, M., Ida, E. I. (2009). Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho. *Química Nova*, 32, 7, 1787-1791.

Fuh, W. S., Chiang, B. H. (2001). Dephytinisation of rice bran and manufacturing a new food ingredient. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 1419-1425.

Graf, E., Eaton, J. W. (1990). Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 8, 61-69.

Graf, E., Empson, K. L., Eaton, J. W. (1987). Phytic acid. A natural antioxidant. *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 11647-11650.

Gupta, S., Chandi, G. K., Sogi, D. S. (2008). Effect of extraction temperature on functional properties of rice bran protein concentrates. *International Journal of Food Engineering*, 4, art. 8. Available in <<http://www.bepress.com/ijfe/vol4/iss2/art8>>.

- Han, Y. W. (1988). Removal of phytic acid from soybean and cottonseed meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 1181-1183.
- Harbach, A. P. R., Costa, M. C. R., Soares, A. L., Bridi, A. M., Shimokomaki, M., Silva, C. A., Ida, E. I. (2007). Dietary corn germ containing phytic acid prevents pork meat lipid oxidation while maintaining normal animal growth performance. *Food Chemistry*, 100, 1630-1633.
- Hurrell, R. F. (2004). Phytic acid degradation as a means of improving iron absorption. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 74, 445-452.
- Kasim, A. B., Edwards Jr, H. (1998). The analysis for inositol phosphate forms in feed ingredients. *Journal of Food Science and Agriculture*, 76, 1-9.
- Kolchev, L. A. (1978). Method for producing phytin. United States Patent. N. 4070422.
- Latta, M., Eskin, M. (1980). A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 1313-1315.
- Lee, B. J., Hendricks, D. G. (1995). Phytic acid protective effect beef round muscle lipid peroxidation. *Journal of Food Science*, 60, 2, 241-244.
- Lee, B. J., Hendricks, D. G., Cornforth, D. P. (1998). Antioxidant effects of carnosine and phytic acid in a model beef system. *Journal of Food Science*, 63, 3, 394-398.
- Lee, S. H., Park, H. J., Chun, H. K., Cho, S. Y., Cho, S. M., Lillehoj, H. S. (2006). Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice. *Nutrition Research*, 26, 474-479.

Li, C. Y., Park, D. S., Won, S. R., Hong, A. K., Ham, J. K., Choi, J. K., Rhee, H. I. (2008).

Food chemical properties of low-phytate rice cultivar, Sang-gol. *Journal of Cereal Science*, 47, 262-265.

Liu, Z., Cheng, F., Zhang, G. (2005). Grain phytic acid content in japonica rice as affected by cultivar and environment and its relation to protein content. *Food Chemistry*, 89, 49-52.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

Makower, R. U. (1970). Extraction and determination of phytic acid in beans (*Phaseolus vulgaris*). *Cereal Chemistry*, 47, 288-295.

Nolan, K. B., Duffin, P. A., McWeeny, D. J. (1987). Effects of phytate on mineral bioavailability. In vitro studies on Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} (also Cd^{2+}) solubilities in the presence of phytate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 40, 79-85.

Norazalina, S., Norhaizan, M. E., Hairuszah, I., Norashareena, M. S. (2009). Anticarcinogenic efficacy of phytic acid extracted from rice bran on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62, 3, 259-268.

O'Dell, B. L., De Boland, A., Koirttyohann, S. R. (1972). Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20, 718-721.

- Park, H. R., Ahn, H. J., Kim, S. H., Lee, C. H., Byun, M. W., Lee, G. W. (2006). Determination of the phytic acid levels in infant foods using different analytical methods. *Food Control*, 17, 727-732.
- Parrado, J., Miramontes, E., Jover, M., Gutierrez, J. F., Teran, L. C., Bautista, J. (2006). Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. *Food Chemistry*, 98, 742-748.
- Persson, H., Turk, M., Nyman, M., Sandberg, A. S. (1998). Binding of Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Cd^{2+} to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3194-3200.
- Saunders, R. M. (1990). The properties of rice bran as a food stuff. *Cereal Foods World*, 35, 632-662.
- Saw, N. K., Chow, K., Rao, P. N., Kavanagh, J. P. (2007). Effects of inositol hexaphosphate (Phytate) on calcium binding, calcium oxalate crystallization and in vitro stone growth. *The Journal of Urology*, 177, 2366-2370.
- Shimokomaki, M., Soares, A. L., Ida, E. I., Olivo, R. (1999). Synergism between dietary vitamin E and exogenous phytic acid in prevention of warmed-over flavor in chicken Pectoralis major. In *Proceedings of the 1999 IFT Annual Meeting*. Chicago: IFT. P. 184.
- Soares, A. L., Olivo, R., Shimokomaki, M., Ida, E. I. (2004). Synergism between dietary vitamin E and exogenous phytic acid in prevention of warmed-over flavour

development in chicken breast meat, Pectoralis major M. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47, 57-62.

Sousa, R. A., Silva, J. C. J., Bacchan, N., Cadora, S. (2005). Determination of metals in bottled coconut water using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 399-408.

Statsoft. Inc., 2004. STATISTICA (data analysis software), version 7. Tulsa, Oklahoma, USA.

Stodolak, B., Starzynska, A., Czyszczonek, M., Zyla, K. (2007). The effect of phytic acid on antioxidant stability of raw and cooked meat. *Food Chemistry*, 101, 1041-1045.

Thompson, D. B., Erdman Jr, J. W. (1982). Phytic Acid in Soybeans. *Journal of Food Science*, 47, 513-517.

Uppstrom, B., Svensson, R. (1980). Determination of phytic acid in rapeseed meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31, 651-656.

Vucenik, I., Shamsuddin, A. M. (2006). Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. *Nutrition and Cancer*, 55, 109-125.

Xu, Q., Kanthasamy, A. G., Reddy, M. B. (2008). Neuroprotective effect of the natural iron chelator, phytic acid in a cell culture model of Parkinson's disease. *Toxicology*, 245, 101-108.

Figure captions

Figure 1. Fluxogram for extraction and purification of rice bran phytic acid (PA).

Figure 2. Surface response model for extraction of rice bran phytic acid (PA) as a function of X_2 (HCl concentration) and X_3 (temperature).

Figure 3. Solubility of purified rice bran phytic acid (PA) at pH 4.0, 6.0 and 8.0. Mean values followed by different lower case letters are significantly different from each other ($p < 0.05$) (n=3 replicates).

Figure 1

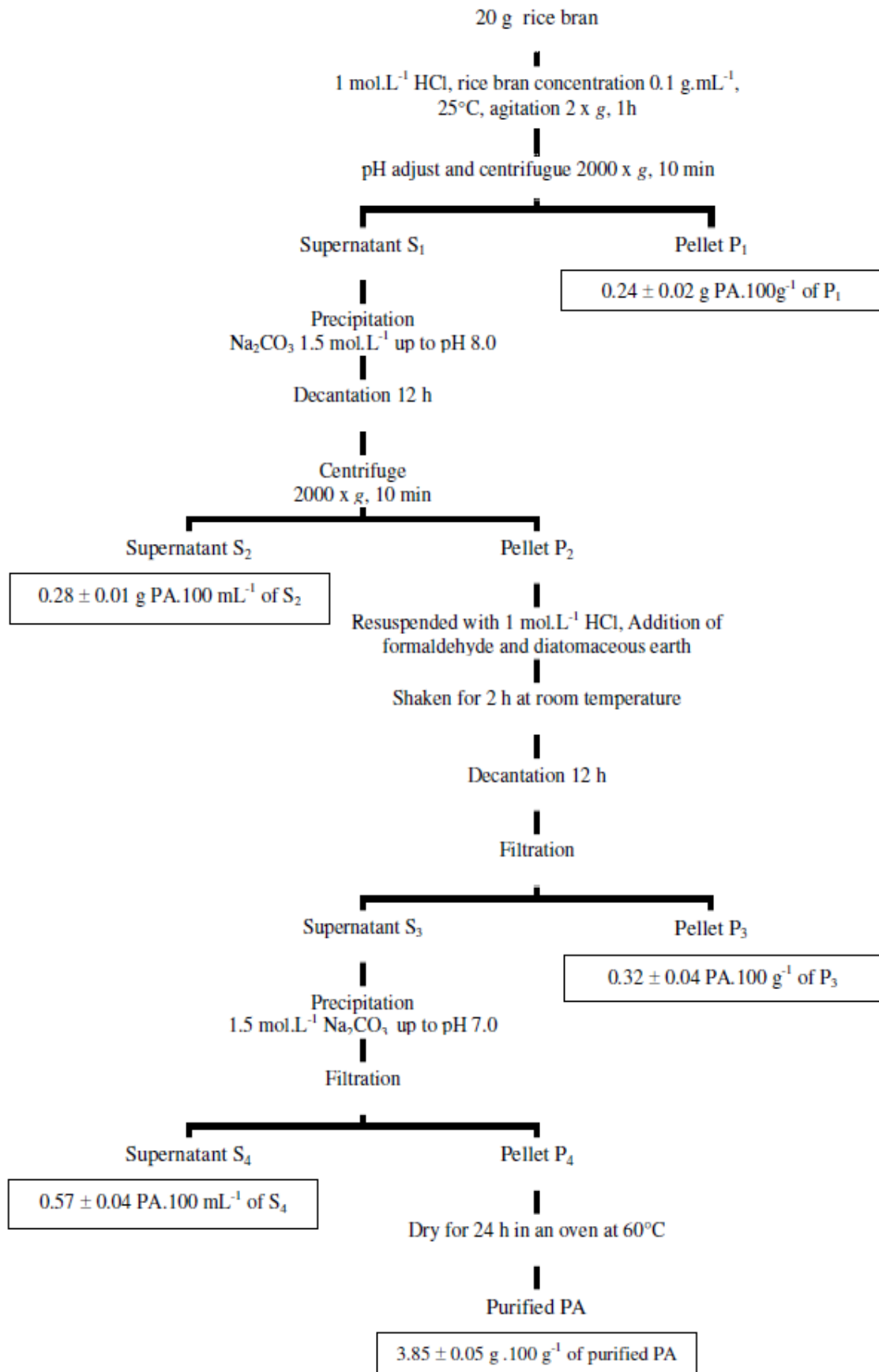


Figure 2

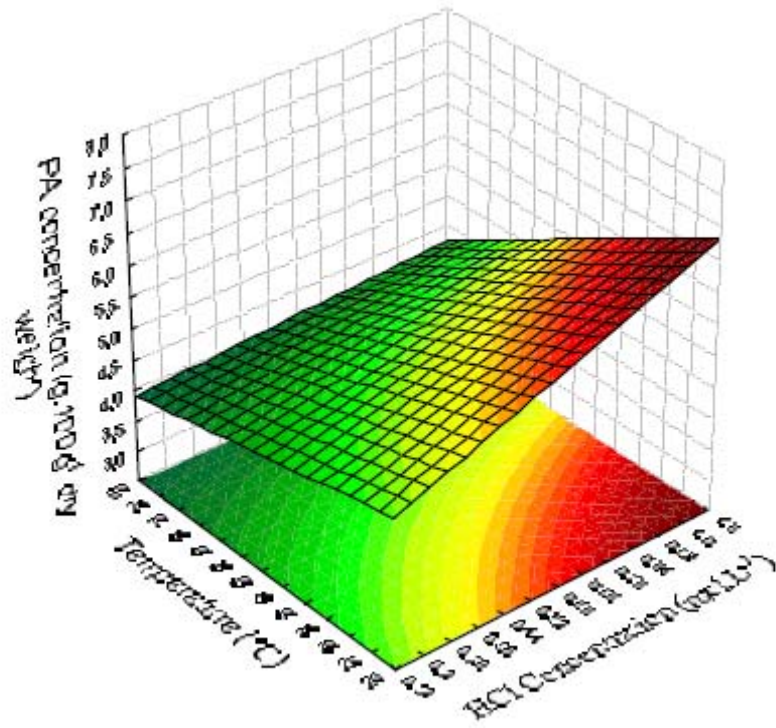


Figure 3

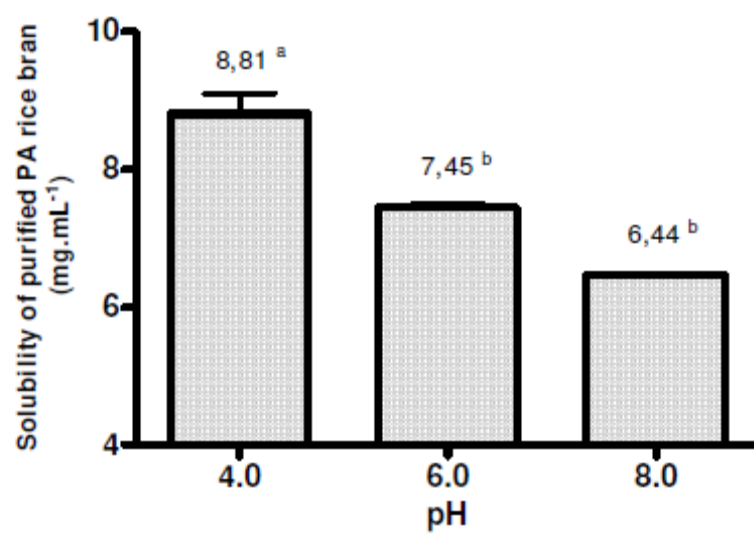


Table 1 – Planning assay 2^4 matrix with independent variables, experimental responses (Y) and estimated responses (\hat{Y}) of phytic acid extracted from rice bran

Assays	Coded (Real)				g of extracted PA.100 g ⁻¹ of rice bran	
	Rice bran (g.mL ⁻¹)	HCl (mol.L ⁻¹)	Temperature (°C)	Time (h)	Y*	\hat{Y}
	$x_1(X_1)$	$x_2(X_2)$	$x_3(X_3)$	$x_4(X_4)$		
1	-1 (0.05)	-1 (0.2)	-1 (25)	-1 (1)	4.96 ± 0.121	4.92
2	1 (0.10)	-1 (0.2)	-1 (25)	-1 (1)	4.96 ± 0.212	5.00
3	-1 (0.05)	1 (1.0)	-1 (25)	-1 (1)	7.08 ± 0.250	7.01
4	1 (0.10)	1 (1.0)	-1 (25)	-1 (1)	5.88 ± 0.090	5.96
5	-1 (0.05)	-1 (0.2)	1 (75)	-1 (1)	3.53 ± 0.891	3.51
6	1 (0.10)	-1 (0.2)	1 (75)	-1 (1)	4.69 ± 0.372	4.72
7	-1 (0.05)	1 (1.0)	1 (75)	-1 (1)	4.34 ± 0.192	4.48
8	1 (0.10)	1 (1.0)	1 (75)	-1 (1)	4.69 ± 0.116	4.55
9	-1 (0.05)	-1 (0.2)	-1 (25)	1 (3)	4.89 ± 0.250	4.94
10	1 (0.10)	-1 (0.2)	-1 (25)	1 (3)	4.51 ± 0.070	4.46
11	-1 (0.05)	1 (1.0)	-1 (25)	1 (3)	6.96 ± 0.054	7.02
12	1 (0.10)	1 (1.0)	-1 (25)	1 (3)	5.47 ± 0.116	5.41
13	-1 (0.05)	-1 (0.2)	1 (75)	1 (3)	3.35 ± 0.222	3.37
14	1 (0.10)	-1 (0.2)	1 (75)	1 (3)	4.04 ± 0.620	4.01
15	-1 (0.05)	1 (1.0)	1 (75)	1 (3)	4.47 ± 0.231	4.33
16	1 (0.10)	1 (1.0)	1 (75)	1 (3)	3.70 ± 0.223	3.83
17	0 (0.075)	0 (0.6)	0 (50)	0 (2)	5.05 ± 0.147	4.97
18	0 (0.075)	0 (0.6)	0 (50)	0 (2)	4.67 ± 0.759	4.97
19	0 (0.075)	0 (0.6)	0 (50)	0 (2)	5.19 ± 0.353	4.97

* Mean ± standard deviation (n=3).

Table 2 – Regression coefficients for response $Y = g$ of extracted phytic acid.100 g^{-1} of sample

Variation source	Regression coefficients	Standard Error	t (45)	p – value
Mean	4.9739	0.1182	42.0734	0.0000*
(X ₁) Rice bran concentration (L)	-0.1026	0.1024	-2.0034	0.0512
(X ₁) Rice bran concentration (Q)	-0.1288	0.2577	-0.9996	0.3229
(X ₂) HCl concentration (L)	0.4786	0.1024	9.3493	0.0000*
(X ₃) Temperature (L)	-0.7441	0.1024	-14.5365	0.0000*
(X ₄) Time (L)	-0.1724	0.1024	-3.3686	0.0016*
(X ₁) x (X ₂)	-0.2847	0.1024	-5.5612	0.0000*
(X ₁) x (X ₃)	0.2798	0.1024	5.4656	0.0000*
(X ₁) x (X ₄)	-0.1408	0.1024	-2.7514	0.0085*
(X ₂) x (X ₃)	-0.2804	0.1024	-5.4777	0.0000*
(X ₂) x (X ₄)	-0.0030	0.1024	-0.0582	0.9538
(X ₃) x (X ₄)	-0.0409	0.1024	-0.7983	0.4289*

*p≤0.05

Table 3 – Linear ANOVA model for predicting the extraction of rice bran phytic acid

Source of Variation	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F _{calculated}
Regression	52.0867	10	5.2087	42.3298
Residuals	5.6603	46	0.1231	
Total	57.7470	56		

% explained variation (R^2) = 90.20 ($F_{0.05, 10, 46} = 2.05$)

^a = sum of squares, ^b = degrees of freedom, ^c = mean squares

Table 4 – Phytic acid contents of the supernatant S₂ with adjustments of pH with 1.5 mol.L⁻¹ Na₂CO₃ or 4 mol.L⁻¹ NaOH

PA content (g.100 mL ⁻¹)		
Supernatant S ₂ pH	1.5 mol.L ⁻¹ Na ₂ CO ₃ Solution	4 mol.L ⁻¹ NaOH Solution
7.0	0.79 ^{ab} ± 0.138	1.41 ^{aA} ± 0.198
7.5	0.44 ^{bB} ± 0.083	0.78 ^{bA} ± 0.039
8.0	0.28 ^{bcB} ± 0.010	0.60 ^{bA} ± 0.014
8.5	0.17 ^{cB} ± 0.018	0.24 ^{cA} ± 0.009
9.0	0.15 ^{cA} ± 0.012	0.12 ^{cA} ± 0.018

* Mean ± standard deviation followed by different lowercase letters in the same column differ by Tukey test (p≤0.05). Mean ± standard deviation followed by capital letters in the same row differ by Tukey test (p≤0.05) (n=3 replicates).

Table 5 – Purity and yield of purified rice bran phytic acid in rice bran for different pH values of S₃ created with 1.5 mol.L⁻¹ Na₂CO₃

Supernatant S ₃	Purity (%)	Yield (%)
7.0	78.19 ^a ± 0.862	73.21 ^a ± 0.905
7.5	71.47 ^a ± 2.948	79.09 ^a ± 4.507
8.0	60.89 ^b ± 6.093	80.04 ^a ± 4.740
8.5	58.26 ^b ± 0.780	82.16 ^a ± 3.868
9.0	41.28 ^c ± 5.300	82.73 ^a ± 7.950

Mean ± standard deviation followed by different lowercase letters in the same column differ by Tukey test (p<0.05) (n=3 replicates).

Table 6 – Content of organic, inorganic and total phosphorus, total nitrogen, soluble and total proteins and minerals in standard and purified rice bran phytic acid

Minerals	PA samples	
	Standard *	Rice bran PA *
Phytate P (mg.g ⁻¹)	124.86 ^a ± 2.779	64.63 ^b ± 2.773
Inorganic P (mg.g ⁻¹)	0.01 ^b ± 0.000	0.11 ^a ± 0.000
Total P (mg.g ⁻¹)	132.36 ^a ± 1.747	103.88 ^b ± 1.167
Total Nitrogen (g.100 g ⁻¹)	0.03 ^b ± 0.000	0.15 ^a ± 0.000
Soluble Proteins (g.100 g ⁻¹)	0.00 ^b ± 0.000	0.60 ^a ± 0.011
Total Proteins (g.100 g ⁻¹)	0.19 ^b ± 0.000	0.94 ^a ± 0.000
Cu (mg.kg ⁻¹)	0.00 ^b ± 0.000	3.00 ^b ± 0.000
Zn (mg.kg ⁻¹)	1.27 ^b ± 0.000	472.19 ^a ± 0.010
Ni (mg.kg ⁻¹)	0.95 ^b ± 0.068	1.00 ^a ± 0.281
Co (mg.kg ⁻¹)	1.05 ^b ± 0.069	4.15 ^a ± 0.074
Mn (mg.kg ⁻¹)	2.45 ^b ± 0.000	820.30 ^a ± 0.022
Fe (mg.kg ⁻¹)	1.36 ^a ± 0.000	732.45 ^b ± 5.453
Ca (g.kg ⁻¹)	0.01 ^b ± 0.000	1.39 ^a ± 0.010
Na (g.kg ⁻¹)	11.00 ^a ± 0.000	11.00 ^a ± 0.000
Mg (g.kg ⁻¹)	0.25 ^b ± 0.000	32.73 ^b ± 0.000
K (g.kg ⁻¹)	0.00 ^b ± 0.000	1.83 ^a ± 0.000

* Mean ± standard deviation followed by different lowercase letters in the same line differ by Tukey test (p≤0.05) (n=3 replicates).

Normas para publicação

Guide for Authors

The *Journal of Food Composition and Analysis* is an official publication of the International Network of Food Data Systems - INFOODS-of the United Nations University, and is sponsored by the Food and Agriculture Organization of the United Nations. Eight issues are published each year.

The *Journal of Food Composition and Analysis* publishes manuscripts on all scientific aspects of data on the composition of human foods, with particular emphasis on analytical methods; actual data on composition of foods; studies on the manipulation, storage, distribution and use of food composition data; and studies on the statistics, use and distribution of such data and data systems. The Journal's basis is nutrient composition, with increasing emphasis on bioactive non-nutrient and anti-nutrient components. A primary goal of the Journal is to provide sufficient description of the food samples, analytical methods, quality control procedures and statistical treatments of the data to permit the end users of the food composition data to evaluate the appropriateness of such data in their projects. Research may be published as Original Research Articles, Short Communications, Critical Reviews, Study Reviews, Reports or Commentaries, according to subject matter and presentation. Assignment will be made by the Editorial Office, but author guidance is appreciated. Only original papers will be considered. Manuscripts are submitted for review with the understanding that the same work has not been copyrighted, published, or submitted for publication elsewhere.

Manuscripts (excluding tables and figures) should not exceed 20 double-spaced pages.

The title should be limited to 15 words or 80 characters. The abbreviated running title should contain no more than 50 characters. The name and contact details (address, telephone, fax numbers and email address) of the corresponding author, to whom proofs and other correspondence are to be sent, should be clearly indicated. American or British spelling will be accepted (e.g. "center" and "centre" are both acceptable); however, any one contribution should be consistent and maintain either American or British style. Use generic names of chemicals whenever possible. Proprietary names and trademarks should appear only to identify the source of the chemical and subsequently only the generic name should be used. Common abbreviations and acronyms should be unpunctuated (e.g. HPLC, not H.P.L.C.).

The decimal point, not the decimal comma, should be used when reporting numeric data in tables and text. Insert a zero in front of a decimal point when it applies. For instance, instead of .36 use 0.36. All numeric data must be presented to an appropriate number of significant digits (for a discussion of significant digits in food composition data, see Greenfield, H. and Southgate, D.A.T., 2003, *Food composition data: Production, Management and Use*, 2nd ed., FAO, Rome; in particular ch. 9 (pp. 163-170), and Table 9.1. Download at http://www.fao.org/infoods/publications_en.stm). The International System of Units (SI, Systeme International d'Unites) or the SI-derived system should be used in reporting units of measurement, including dates in the format of year-month-day. Energy should be given as kJ or MJ (equivalent kcal or Mcal may be given in parentheses). The Centigrade scale (C°) may be used for temperature.

Actual analytical data should be reported. For example, report nitrogen in addition to a calculated protein value, or define the nitrogen to protein ratio clearly under Materials and Methods and thereafter use protein. All factors used in calculations (e.g. energy), and all components used in aggregations (e.g. retinol equivalents), should be specified. Carbohydrate reported as "Total carbohydrate by difference" is not acceptable in Results or in tables; however, it may be used in discussions. Use of "crude fibre" is discouraged.

Preparation of text files for online submission

The manuscript should be prepared in word processing software (Word, Works, WordPerfect, Latex etc). It is preferable to use Times as the type font (size 12), with 2.5 cm (1 inch) margins on all sides; use double spacing and one column. Automatic line numbering should be activated; it is best to select "continuous" so that the lines are numbered continuously and do not begin over again at "1" on each new page.

When submitting your paper in EES, please upload each figure file individually. Elsevier's preferred file formats for figures are EPS, TIFF and PDF. MS Office file formats are only allowed under certain conditions. Please remove individually uploaded figures and tables from your manuscript text file. Otherwise, each figure will appear twice in your PDF file. Please see below ("Graphics and artwork other than text") concerning file formats for figures and artwork.

Files must be uploaded as document (.doc) files (or rich text format (.rtf) if using Microsoft Works); please do not submit your files as PDF files (.pdf).

The abstract (200 words maximum) must briefly summarize major findings and conclusions. Do not use statements such as "Results are discussed". Many abstracting services use abstracts without modification, so this section should be able to stand alone and be comprehensible without the rest of the paper (do not refer to items in the reference list which will not accompany the abstract in some instances).

A minimum of 6-10 keywords must be listed. Authors should bear in mind that keywords allow the article to be found by Internet database search engines and considerably increase article citations when they are as numerous and comprehensive as possible.

As a general guideline, reports of original research should be presented with sections identified as

Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions and References.

In the Introduction, briefly review important prior publications and state the reasons for the investigation that is being reported. Under Materials and Methods, describe and cite where applicable sampling protocols, sample handling/preparation, and all experimental conditions and procedures (including quality control/quality assurance procedures), with sufficient clarity to permit qualified researchers to repeat the work. This section must include the number/size of samples collected, prepared and extracted, as well as number of analytical replicates per sample; and the statistical procedures/programs used to assess the work should be cited. A minimum of three individual samples must be analysed for each reported mean value, along with some indication of variability. When only one or two samples have been analysed, notwithstanding the number of replicates, authors should present the normal precision of their assays and then report the mean (without a standard deviation). Data must be reported to the appropriate number of significant digits for that precision and instrumental sensitivity. The data and the statistical interpretation should be presented in the Results section. Authors may wish to combine Results and Discussion or Discussion and Conclusions in one section. In the Conclusions section, important and novel aspects of the work should be summarized and suggestions for future research are appropriate.

Graphics and artwork other than text

Authors are strongly advised to consult Elsevier's artwork instructions before uploading any graphics files into EES. Please note that, in general, "live" files of figures must be submitted (e.g. TIFF, EPS or PDF; there are some exceptions). Please use the very simplest grid model for tables (i.e. avoid excessive formatting). The Elsevier website provides all necessary information for authors, and may also be contacted by e-mail at sqsartwork@elsevier.com.

Standards

All abbreviations, chemical names, and journal names should follow the style of Chemical Abstract Service. A useful writing guide is *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors and Publishers*, Style Manual Committee Council of Biology Editors, 1994, 6th ed., Cambridge University Press.

References

Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the authors. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list at the end of the manuscript (and vice versa).

All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

2. Two authors: both authors' names and the year of publication;

3. Three or more authors: first author's name followed by et al. and the year of publication. Citations may be made directly or parenthetically. Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, b, 1999; Allan & Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown..."

References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references must be arranged alphabetically on authors' names, and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and full title of journals, publisher and year.

Titles of periodicals mentioned in the list of references must be spelled out in full.

In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained.

However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

References concerning unpublished data and "personal communications" must not be cited in the reference list but may be mentioned in the text, giving the full details (name and affiliation of the contact). References included in the reference list as "in press" should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication data with "in press". Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication. In the final publication, material referenced as "submitted" is not acceptable - if it cannot be referenced as "in press" then the text needs to be revised to state "unpublished results" and the reference deleted from the reference list.

The following are examples of reference layouts. Please use a hanging indent (second and subsequent lines indented).

Reference to a chapter in a monograph:

Maubois, J.-L., & Olivier, G. (1992). Milk protein fractionation. In *New applications of membrane processing* (pp. 112-120). Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

Reference to a chapter (capitulo) in a book

De Kruif, C. G., & Holt, C. (2003). Casein micelle structure, functions and interactions. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry, Vol. 1: Proteins* (3rd ed) (pp.233-276). New York, NY, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Reference to an article in a journal:

Schakel, S. F., Harnack, L., Wold, C., Van Heel, N., Himes, J.H. (1999). Incorporation of trans-fatty acids into a comprehensive nutrient database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12, 323-331.

Note: If necessary, cite issue number if page numbering is not continuous.

Reference to a book

: Marsh, D. (1990). *CRC handbook of lipid bilayers*. Boston, MA, USA: CRC Press.

Reference to a published standard

: IDF (1982). *Cheese and processed cheese-determination of total solids content*. IDF Standard 4a. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

Reference to a paper in published conference proceedings

: Maubois, J. L. (1998). Fractionation of milk proteins. In *Proceedings of the 25th International Dairy Congress* (Vol. II, pp. 74-86). Dairy Science and Technology: Aarhus, Denmark.

Reference to a thesis

: Alting, A. C. (2003). Cold gelation of globular proteins. PhD Thesis, Wageningen University, The Netherlands.

Note: *The thesis should be publicly available.*

For Website references:

INFOODS (2005). Tagnames for Food Components. Retrieved March 21, 2006 from:  http://www.fao.org/infoods/tagnames_en.stm.

5.2 Artigo Científico 2: Capacidade Antioxidantes do Ácido Fítico Purificado de Farelo de Arroz. Submetido à Química Nova. As normas para publicação estão anexadas após o artigo.

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO FÍTICO PURIFICADO DE FARELO DE ARROZ

Cristiane Canan, Fernanda Delaroza, Massami Shimokomaki, Elza Louko Ida*

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990 Londrina-PR, Brasil.

Rúbia Casagrande

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990 Londrina-PR, Brasil.

*e-mail: elida@uel.br

PURIFIED RICE BRAN PHYTIC ACID ANTIOXIDANT CAPACITY - The antioxidant capacity of phytic acid (PA) purified from rice bran was evaluated. Using 2,4,6-tripyridil-s-triazine was not detected reducing Fe^{2+} activity by standard PA neither with purified PA. With bathophenanthroline the activity of Fe^{2+} chelator of standard PA and rice bran PA were dependent on the concentration and contact time and observed the IC_{50} of 4.39mg/mL and IC_{50} of 7.54mg/mL, respectively. In the method with deoxirribose the standard PA inhibited the hydroxyl radical with IC_{50} of 0.70mg/mL, while the rice bran PA showed maximum inhibitory activity of 40% associated to its chelating activity confirming this strong antioxidant capacity.

Keywords: Phytic acid. Iron ion. Hydroxyl radical.

INTRODUÇÃO

O ácido fítico (AF) ou 1,2,3,4,5,6 hexafosfato de hidrogênio (IP6) é uma molécula carregada negativamente em ampla faixa de pH e possui 12 prótons substituíveis.¹ Estas características permitem a formação de complexos devido a sua capacidade quelante com metais polivalentes, especialmente cátions di e trivalentes, tornando-os bioindisponíveis.^{2,3} O AF está distribuído nos diferentes componentes do arroz e 80% do fósforo fítico está concentrado no pericarpo e aleurona, 7,6% no germe e 1,2% no endosperma.⁴ O farelo de arroz é constituído de pericarpo, aleurona e o germe que apresenta elevado teor de AF, próximo de 6,02%.⁵

O AF é um antioxidante efetivo e economicamente viável para preservar materiais biológicos sensíveis ao oxigênio devido a sua capacidade quelante de íons metálicos multivalentes, especialmente ferro, zinco e cálcio.⁶ A capacidade de formar quelato com o ferro tornado-o cataliticamente inativo faz com que o AF seja um forte inibidor da produção de radical hidroxil (OH[•]) mediada pelo ferro.⁷ Além disso, altera o potencial redox do ferro mantendo-o na forma férrica (Fe³⁺). Este efeito oferece proteção contra danos oxidativos, visto que o Fe²⁺ causa produção de oxirradicais de lipídios, enquanto que o Fe³⁺ é relativamente inerte.^{6,8}

Uma maneira de combater o estresse oxidativo e a oxidação lipídica em alimentos consiste na utilização de antioxidantes para impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas.^{9,10} Os antioxidantes sintéticos mais utilizados são BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno), PG (propil galato) e TBHQ (terc-butil hidroquinona). O emprego destes antioxidantes tem sido questionado quanto a sua inocuidade e, portanto, os antioxidantes naturais, são amplamente investigados.^{11,12} Os principais antioxidantes naturais que se destacam são o ácido ascórbico,^{13,14,15} vitamina E,^{16,17} vitamina A e carotenóides,¹⁸ compostos fenólicos,¹¹ extratos de plantas,¹² γ -orizanól^{19,20} e AF^{3,6,8,13,21,22,23,24}

Filgueiras et al²⁴ confirmaram o potencial antioxidante do AF purificado do germe de milho por meio de ensaios de deoxirribose e batofenantrolina e concluíram que a capacidade antioxidante aumentou com a elevação da concentração do AF purificado. A ação antioxidante de AF de extratos alcoólicos obtidos de arroz selvagem reduziu

significativamente o TBARS quando adicionados a carne bovina e gordura suína armazenadas sob refrigeração.²⁵

Vários métodos foram desenvolvidos para determinar a capacidade antioxidante de um composto químico.²⁶ Porém, não existe um método preciso simples e universal que permite uma comparação adequada de resultados,²⁷ além disso os diversos métodos são utilizados para avaliar diferentes mecanismos antioxidantes. O método de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) mede a redução férrica de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) para um produto colorido.²⁸ O método da batofenantrolina (BPS) utiliza o sistema de quelar íons Fe^{2+} ²⁹ e o método da deoxirribose verifica a diminuição da formação de substâncias reativas ao TBA provenientes da degradação do açúcar deoxirribose pelo radical hidroxil gerado pela reação de Fenton.²⁷

Portanto, considerando a atuação do AF como antioxidante, suas várias aplicações e elevada concentração no farelo de arroz, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante do AF purificado do farelo de arroz utilizando os métodos de FRAP, BPS e deoxirribose.

PARTE EXPERIMENTAL

Material

O AF do farelo de arroz integral foi purificado a partir da cultivar IRGA 417 fornecido pelo Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA) de Cachoeirinha/RS, safra 2007/2008, a partir da extração com HCl 1,0 mmol.L⁻¹ (1:10 p/v), 25 °C e agitação a 2 g por 1 h seguido de ajuste de pH, etapas de precipitação, filtração e secagem. Foi utilizado como padrão o fitato de dodecassódio do arroz (P0109, Sigma) com pureza >90%. Os reagentes 2-deoxi-D-ribose e o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX) foram obtidos da Sigma (St. Louis, USA) e batofenantrolina dissulfônica ácida (BPS) e 2,4,6-tri-piridil-s-triazina (TPTZ) da Acros Organics (Geel, Bélgica). Os demais reagentes foram obtidos de outras procedências comerciais e de grau analítico para análise.

Capacidade redutora do íon ferro pelo AF utilizando o método de FRAP

O poder de redução do AF foi avaliado de acordo com Sánchez-Gonzalez et al.²⁸ com algumas modificações. Para análise, foram adicionados 3 mL do reagente FRAP e 100 µL de diferentes concentrações de AF padrão ou ácido purificado do farelo de arroz (0,028; 0,141; 0,353; 0,706; 1,412; 1,765; 2,824 e 7,060 mg/mL) e realizada a leitura da absorbência à 593 nm³⁰ após 30 min à 37 °C. O reagente FRAP foi utilizado como branco e preparado com mistura de tampão acetato de sódio 0,3 mmol.L⁻¹ e pH 3,6; solução de TPTZ 10 mmol.L⁻¹ em HCl 40 mmol.L⁻¹ e solução de cloreto férrico 20 mmol.L⁻¹ na proporção de volumes de 10:1:1, respectivamente, no momento da análise. A solução foi incubada a 37°C por 30 min. O poder redutor foi expresso como umol equivalente de Trolox por grama de AF padrão ou do farelo de arroz. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Capacidade queladora do íon ferro pelo AF utilizando o método de BPS

A capacidade queladora do íon Fe²⁺ pelo AF foi determinada segundo Bolanm & Ulvik²⁹ utilizando a BPS. Primeiramente, avaliou-se o tempo de contato entre o íon Fe²⁺ e o AF padrão por diferentes tempos no meio de reação antes da adição de BPS. Neste ensaio, 50 mmol.L⁻¹ de (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ e 50 µL de AF padrão nas concentrações de 4,41; 17,65 e 141,20 µg/mL foram mantidos em contato por 0, 15, 30, 60 ou 120 min em 2 mL de meio de reação contendo 125 mmol.L⁻¹ de sacarose, 65 mmol.L⁻¹ de KCl e 10 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl e pH 7,4 (meio I). Posteriormente, 0,2 mmol.L⁻¹ de BPS foram adicionados e a mistura de reação foi mantida a temperatura ambiente por 15 min. A capacidade queladora do ferro foi determinada pela formação do complexo colorido Fe₂(BPS)₃ e leitura em espectrofotômetro em 530 e 700 nm conforme Casagrande et al.³¹

Após definir o melhor tempo de contato de 60 min de reação entre o AF e íon Fe²⁺ antes da adição da BPS foram preparadas soluções de AF padrão ou AF purificado do farelo de arroz com 3,530 mg/mL em HCl 0,02 mmol.L⁻¹. Posteriormente, foram diluídas em água deionizada para obter concentrações de 2,2; 4,4; 8,8; 35,3; 88,3; 176,5; 353,0 e 1765,0 µg/mL. Para determinação da curva de concentração resposta, 50 µmol.L⁻¹ de (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ e 50 µL das diferentes concentrações de AF padrão ou AF purificado do

farelo de arroz foram mantidos a temperatura ambiente por 60 min em 2 mL de meio I. Em seguida, foram adicionados 0,2 mmol.L⁻¹ de BPS e seguiu-se o procedimento conforme descrito anteriormente. Foram feitos concomitantemente o branco (meio de reação) e o controle positivo (meio de reação + Fe²⁺ + BPS). Os ensaios foram realizados em triplicata.

A capacidade antioxidante foi expressa como % de capacidade queladora do íon Fe²⁺ pelo AF e estimada conforme a equação (1).

$$\text{Capacidade Antioxidante (\%)} = 100 - \left(\frac{100A_a}{A_0} \right) \quad \text{Equação (1)}$$

Onde, A_a é a absorbância da amostra (530 nm - 700 nm) e A_0 é a absorbância do controle positivo (530 nm - 700 nm).

Capacidade inibitória do radical hidroxil pelo AF utilizando o método de deoxirribose

A diminuição da formação de substâncias reativas ao TBA provenientes da degradação do açúcar deoxirribose pelo radical hidroxil gerado pela reação de Fenton foi determinada segundo Halliwell et al.²⁷ Uma solução de AF padrão a 14,12 mg/mL foi preparada com água deionizada e posteriormente diluída para obter as concentrações de 0,028; 0,141; 0,353; 0,706; 1,412; 1,765; 2,824 e 7,060 mg/mL. Para o AF purificado do farelo de arroz foi preparada uma solução saturada em água deionizada, filtrada em papel de filtro qualitativo e o teor de AF foi quantificado (2,280 mg/mL) de acordo com o procedimento descrito por Latta & Eskin³² com modificações da resina para DOWEX-AGX-4 conforme Ellis & Morris.³³ Em seguida, procedeu-se a diluição desta solução para obter as concentrações de 0,023; 0,045; 0,091; 0,280; 0,285; 0,456 e 1,140 mg/mL. Foram misturados em tubos de ensaios contendo 1 mL de tampão KH₂PO₄-KOH (20 mmol.L⁻¹ e pH 7,4), 100 µmol.L⁻¹ de ascorbato, 500 µL das diferentes concentrações de AF padrão ou AF purificado do farelo de arroz, 2,8 mmol.L⁻¹ de deoxirribose, 1 mmol.L⁻¹ de H₂O₂, 50 µmol.L⁻¹ de Fe₃Cl.6H₂O, 52 µmol.L⁻¹ de EDTA. Os tubos, contendo a mistura de reação, foram incubados a 37°C por 30 min. Após este período, 1 mL de TBA 1% preparado em 50 mmol.L⁻¹ de NaOH, 100 µL de

NaOH 10 mol.L⁻¹ e 500 µL de H₃PO₄ 20% foram adicionados aos tubos e os mesmos foram incubados a 85 °C por 20 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 535 nm a temperatura ambiente. Foram feitos simultaneamente o branco (ausência de deoxirribose), o controle positivo (ausência de AF) e um controle negativo (ausência de ferro). A capacidade antioxidante foi expressa como % de inibição do radical hidroxil pelo AF conforme a equação (1).

Precisão do Método

A precisão da análise para a determinação da capacidade queladora do íon ferro pelo AF padrão utilizando o método de BPS foi determinada pela repetibilidade (intra-ensaio) e precisão intermediária (inter-ensaio). A repetibilidade, para o ensaio foi avaliada no mesmo dia por meio de análises de amostras com a mesma concentração (40 e 180 µg/mL de AF padrão). A precisão intermediária foi determinada nas mesmas concentrações e comparadas as análises em 3 dias diferentes. A repetibilidade (intra-ensaio) e precisão intermediária (inter-ensaio) do ensaio de deoxirribose foi avaliada por Filgueiras et al.²⁴ e do método de FRAP não foi determinado por ser negativo para o AF.

Análises Estatísticas

Para avaliar a influência do tempo no método de BPS os dados foram estatisticamente analisados utilizando-se a ANOVA de uma via seguido do teste-t de comparações múltiplas de Bonferroni (Programa GraphPad Prism[®], Versão 4.00, 2003). As concentrações de AF padrão ou purificado do farelo de arroz para inibir o processo oxidativo em 50% (IC₅₀) foi estimada pelo mesmo software utilizando uma curva hiperbólica. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão médio (EPM) e considerado significativamente diferente quando foi obtido p<0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capacidade redutora do íon ferro pelo AF utilizando o método de FRAP

O método de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) determina a redução férrica de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) para um produto colorido. A reação detecta compostos com potencial redox $<0,7$ V (o potencial redox do Fe^{3+} -TPTZ). Em condições ácidas, o íon Fe^{2+} forma um complexo de coloração amarela com 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (Fe^{2+} -TPTZ) que pode ser medido em espectrofotômetro em 593 nm.²⁸

O íon Fe^{3+} ou ferro quelato pode iniciar as reações da peroxidação lipídica na presença de um agente redutor do Fe^{3+} para Fe^{2+} ,³⁴ visto que o Fe^{2+} é o que causa a produção de oxirradicais e peroxidação de lipídios, enquanto o Fe^{3+} é relativamente inerte.^{6,8} Neste ensaio, não foi detectada a capacidade redutora do íon ferro pelo AF padrão ou AF purificado do farelo de arroz utilizando a TPTZ e confirma os estudos de Lee & Hendricks,¹³ que ao adicionarem o AF, provocou a oxidação do Fe^{2+} para Fe^{3+} . Segundo os mesmos autores, este é um outro fator que o caracteriza como inibidor da formação de radicais hidroxil pela reação de Fenton e conseqüentemente relaciona com a sua habilidade de inibir a formação de TBARS pela degradação da deoxirribose, ou seja, o AF altera o potencial redox do ferro mantendo-o na forma férrica (Fe^{3+}).

Capacidade queladora do íon ferro pelo AF utilizando o método de BPS

A BPS é um forte quelador de íon ferro e forma com este íon um complexo colorido com forte absorção em 530 e 700 nm. Os metais de transição como o ferro pode catalisar a geração de espécies reativas de oxigênio como o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), que podem propagar a peroxidação lipídica via reação em cadeia.³⁵

A Figura 1 apresenta o efeito de diferentes concentrações de AF padrão e tempos de contato com o ferro para formação do complexo Fe^{2+} e AF antes da adição da BPS. A capacidade queladora do AF padrão foi dependente significativamente da concentração do AF, ou seja, aumentou com elevação da concentração de 0,110 a 3,530 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AF e do tempo de contato com o ferro para a formação do complexo Fe^{2+} -AF antes da adição da BPS, confirmando assim o potencial do AF em quelar os íons Fe^{2+} . Porém, foi observada

uma maior afinidade entre a BPS e o Fe^{2+} do que o AF e o Fe^{2+} , pois quando o AF e BPS foram adicionados simultaneamente no meio de reação, ou seja, no tempo 0, ocorreu uma baixa capacidade queladora do AF pelo íon Fe^{2+} . No entanto com contato prévio de 15, 30, 60 ou 120 min entre o AF padrão e o Fe^{2+} antes da adição de BPS, a capacidade queladora do AF pelo íon Fe^{2+} aumentou significativamente ($p < 0,05$). Assim, foi estabelecido o tempo de 60 min como o tempo de contato entre o AF e o Fe^{2+} para estudo da capacidade quelante do AF, apesar de diferir significativamente do tempo 120 min. No tempo de 120 min foi observado que o complexo formado não foi estável, ou seja, apresentou baixa absorvância do controle positivo provavelmente devido à oxidação do ferro quando exposto por tempo prolongado em solução antes da adição da BPS (Figura 2).

Quando comparada a capacidade queladora de Fe^{2+} do AF padrão e AF purificado do farelo de arroz após 60 min de adição de BPS, foi observado um IC_{50} de 4,39 $\mu\text{g/mL}$ e IC_{50} de 7,54 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figuras 3A e 3B). Estes resultados demonstraram que o AF padrão apresentou uma maior capacidade de quelação de íons Fe^{2+} , quando comparado ao AF purificado do farelo de arroz. Resultados semelhantes também foram descritos por Filgueiras et al.²⁴ que avaliaram a capacidade queladora do AF purificado do germe de milho utilizando o ensaio da BPS e observaram maior capacidade de quelação de íons Fe^{2+} pelo AF padrão.

Embora haja evidências de que a capacidade antioxidante do AF depende da quelação do íon Fe^{2+} , o mecanismo de interação entre o AF e minerais ainda não está totalmente esclarecido.³⁶ Os resultados do ensaio da batofenantrolina comprovaram que o AF forma um quelato com o ferro tornando-o cataliticamente inativo.⁷ Este efeito oferece proteção contra danos oxidativos, visto que o Fe^{2+} causa produção de oxirradicais e peroxidação de lipídios,^{6,8} ocasionando o desenvolvimento de sabores indesejáveis, descoloração e perda do valor nutricional dos alimentos devido à destruição de vitaminas e ácidos graxos essenciais e produção de substâncias potencialmente tóxicas como óxidos de colesterol e o malonaldeído, que é o maior produto secundário da oxidação lipídica, e apresenta efeito citotóxico, carcinogênico, mutagênico, sendo detectado com o 2-ácido tiobarbitúrico que é a base de muitos testes utilizados para investigar a rancificação.^{9,37}

A precisão do ensaio utilizando a BPS também foi avaliada e os coeficientes de variação (CV) intra-ensaios variaram de 6,34 a 9,39% para concentração de 40 µg/mL e de 2,89 a 4,22% para a concentração de 180 µg/mL de AF padrão. Os CV inter-ensaio para as concentrações de 40 µg/mL e de 180 µg/mL, foram respectivamente de 9,84 e 5,99%. Segundo ANVISA, o CV menor do que 15% indica que o método apresenta uma boa precisão.³⁸

Figura 1, Figura 2 e Figura 3

Capacidade de inibição do radical hidroxil pelo AF utilizando o método de deoxirribose

O método de deoxirribose foi utilizado para verificar se o AF é eficiente na inibição do radical hidroxil que atua na degradação do açúcar deoxirribose, formando substâncias reativas ao TBA. Na Figura 4A, observa-se que o AF padrão apresentou IC₅₀ de 0,70 mg/mL, enquanto que o AF purificado do farelo de arroz apresentou capacidade de inibição do radical hidroxil máxima, próxima de 40% (Figura 4B), provavelmente devido sua baixa pureza (60%) em relação ao padrão (>90%) e a sua solubilidade que na concentração máxima em solução, não foi suficiente para bloquear o sítio de coordenação reativo do complexo Fe³⁺-EDTA. A formação de radicais hidroxilas catalisada pelo ferro requer a disponibilidade de pelo menos um sítio de coordenação reativo e muitos quelantes aumentam a função catalítica deste íon. Entretanto, existem poucos quelantes que preservam a solubilidade do ferro e o tornam totalmente inerte, como ocorre com o AF.³⁹ Em soluções aquosas os seis sítios de coordenação do ferro trivalente são ocupados pela água ou íons hidróxido. Muitos agentes quelantes deslocam cinco destes ligantes e formam um quelato pentadentado com a água ocupando o sexto sítio de coordenação. No caso do EDTA que foi utilizado no ensaio da deoxirribose, ocorre a formação de um quelato hexadentado, porém, devido seu pequeno tamanho este distorce o quelato e produz um sétimo sítio disponível para a água, aumentando a solubilidade do ferro. Entretanto, o AF é o único que ocupa os seis sítios de coordenação e desloca todas as águas de coordenação do complexo

Fe³⁺-fitato⁴⁰ e é um dos raros quelantes que em proporções molares de 0,25 ou mais de fitato para ferro, bloqueiam a geração de radicais livres.³⁹

Figura 4 e Figura 5

CONCLUSÃO

No método utilizando a BPS, o AF purificado do farelo de arroz apresentou capacidade queladora do íon ferro que foi dependente da concentração e tempo de contato com o ferro para a formação do complexo Fe²⁺-AF antes da adição da BPS. Além disso, foi observada a inibição do radical hidroxil pelo AF que confirma também esta importante capacidade antioxidante.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro ao CNPq.

REFERÊNCIAS

1. Tsao, G.T.; Zheng, Y.; Lu, J.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1997**, *63*, 731.
2. Vohra, P.; Gray, G.A.; Kratzer, F.H.; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1965**, *120*, 447.
3. Graf, E.; Eaton, J. W.; *Free Radical Bio Med.* **1990**, *8*, 61.
4. O'Dell, B. L.; De Boland, A.; Koirtiyohann, S. R.; *J. Agr. Food Chem*, **1972**, *20*, 718.
5. Kasim, A. B.; Edwards Jr, H.; *J. Agr. Food Chem.* **1998**, *76*, 1.
6. Graf, E.; Empson, K. L.; Eaton, J. W.; *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11647.
7. Graf, E.; Eaton, J. W.; *Cancer* **1985**, *56*, 717.
8. Empson, K. L.; Labuza, T. P.; Graf, E.; *J. FoodSci*, **1991**, *56*, 560.
9. Gray, J. I.; Gomaa, E. A.; Buckley, D. J.; *Meat Sci*, **1996**, *43*, S111.
10. Aruoma, O. I.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, 199.
11. Frankel, E. N.; Huang, S. W.; Prior, E.; Aeschbach, R.; *J. Sci. Food Agr.* **1996**, *72*, 201.

12. Fernández-López, J.; Zhi, N.; Alezon-Carbonell, L.; Pérez-Alvarez, J. A.; Kuri, V.; *Meat Sci.* **2005**, 69, 371.
13. Lee, B. J.; Hendricks, D. G.; *J. Food Sci.* **1995**, 60, 241.
14. Grobbel, J. P.; Dikeman, M. E.; Yancey, E. J.; Smith, J. S.; Kropf, D. H.; Milliken, G. A.; *Meat Sci.* **2006**, 72, 47.
15. Mancini, R. A.; Hunt, M. C.; Seyfert, M.; Kropf, D. H.; Hachmeister, K. A.; Herald, T. J.; Johnson, D. E.; *Meat Sci.* **2007**, 75, 39.
16. Olivo, R.; Shimokomaki, M. Em *Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes*; Shimokomaki, M.; Olivo, R.; Terra, N. N.; Franco, B. D. G. M., eds.; Varela: São Paulo, 2006.
17. Olivo, R.; Soares, A. L.; Ida, E. I.; Shimokomaki, M.; *Rev. Bras. Ciênc. Avíc.* **2002**, 4, 28.
18. Palace, V. P.; Khaper, N.; Qin, Q.; Singal, P. K.; *Free Radical Bio. Med.* **1999**, 26, 746.
19. Lai, P.; Li, K. Y.; Lu, S.; Chen, H. H.; *Food Chem.* **2009**, 117, 538.
20. Butsat, S.; Siriamornpun, S.; *Food Chem.* **2010**, 119, 606.
21. Soares, A. L.; Olivo, R.; Shimokomaki, M.; Ida, E. I.; *Braz. Arch. Biol. Techn.* **2004**, 47, 57.
22. Harbach, A. P. R.; Costa, M. C. R.; Soares, A. L.; Bridi, A. M.; Shimokomaki, M.; Silva, C. A.; Ida, E. I.; *Food Chem.* **2007**, 100, 1630.
23. Stodolak, B.; Starzynska, A.; Czyszczoh, M.; Zyta, K.; *Food Chem.* **2007**, 101, 1041.
24. Filgueiras, C. T.; Casagrande, R.; Soares, A. L.; Shimokomaki, M.; Ida, E. I.; *Quím. Nova* **2009**, 32, 1787.
25. Wu, K.; Zhang, W.; Addis, P. B.; Epley, R. J.; Salih, A. M.; Lehrfeld, J.; *J. Agr Food Chem.* **1994**, 42, 34.
26. Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K.; *J. Agr. Food Chem.* **2005**, 53, 4290.
27. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; Aruoma, O. I.; *Anal. Biochem.* **1987**, 165, 215.
28. Sánchez-González, I.; Jiménez-Escrig, A.; Saura-Calixto, F.; *Food Chem.* **2005**, 90, 133.
29. Bolanm, B.J.; Ulvik, R.J.; *Biochem. J.* **1987**, 243, 55.
30. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1841.
31. Casagrande, R.; Georgetti, S. R.; Verri, W. A., JR; Jabor, J. R.; Santos, A. C.; Fonseca, M. J. V.; *AAPS PharmSciTech.* **2006**, 7, E1.

32. Latta, M.; Eskin, M.; *J. Agr. Food Chem.* **1980**, 28, 1313.
33. Ellis, R.; Morris, E. R.; *Cereal Chem.* **1986**, 63, 58.
34. Braughler, J. M.; Duncan, L. A.; Chase, R. L.; *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 10282.
35. Halliwell, B.; Chirico, S.; *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, 57, 715S.
36. Febles, C. I.; Arias, A.; Hardisson, A.; Rodriguez-Alvarez, C.; Sierra, A.; *Food Chem.* **2001**, 74, 437.
37. Gardner, H. W.; *J. Agr Food Chem.* **1979**, 27, 220.
38. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA; Resolução RE nº 899, **2003**.
39. Gutteridge, J. M. C.; *Biochem. J.* **1984**, 224, 697.
40. Graf, E.; Mahoney, J. R.; Brytan, R. G.; Eaton, J. W.; *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 3620.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Capacidade queladora do íon Fe^{2+} pelo AF padrão. As concentrações de AF utilizadas foram 0,11; 0,44 e 3,53 mg/mL. BPS foi adicionada imediatamente ou após 15, 30, 60 e 120 min da adição do ferro. A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguido de comparações múltiplas de Bonferroni. *Diferença estatística significativa em relação à BPS adicionada após 120 min e # Diferença estatística significativa em relação a BPS adicionada após 60 min ($p < 0,05$) ($n = 3$).

Figura 2. Absorbâncias dos controles positivos nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min. A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguido de comparações múltiplas de Bonferroni. *Diferença estatística significativa em relação à BPS adicionada imediatamente (tempo zero) ($p < 0,05$) ($n = 3$).

Figura 3. Capacidade queladora do AF padrão (A) ou do AF obtido do farelo de arroz (B) pelo íon Fe^{2+} por meio de ensaio de batofenantrolina. Resultados expressos como média \pm EPM ($n = 3$).

Figura 4. Capacidade inibidora do radical hidroxil pelo AF padrão (A) ou AF obtido do farelo de arroz (B) por meio de ensaio de deoxirribose. Resultados expressos como média \pm EPM ($n = 3$).

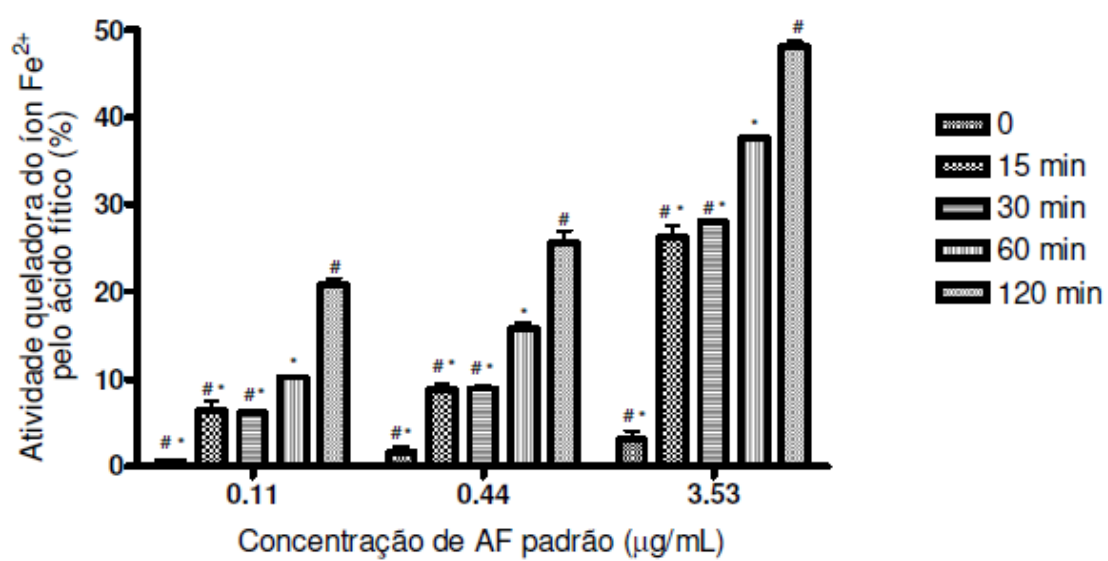


Figura 1

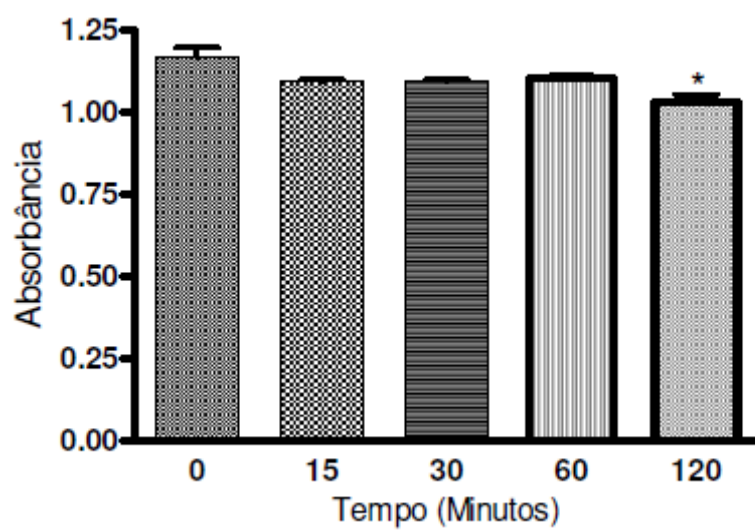


Figura 2

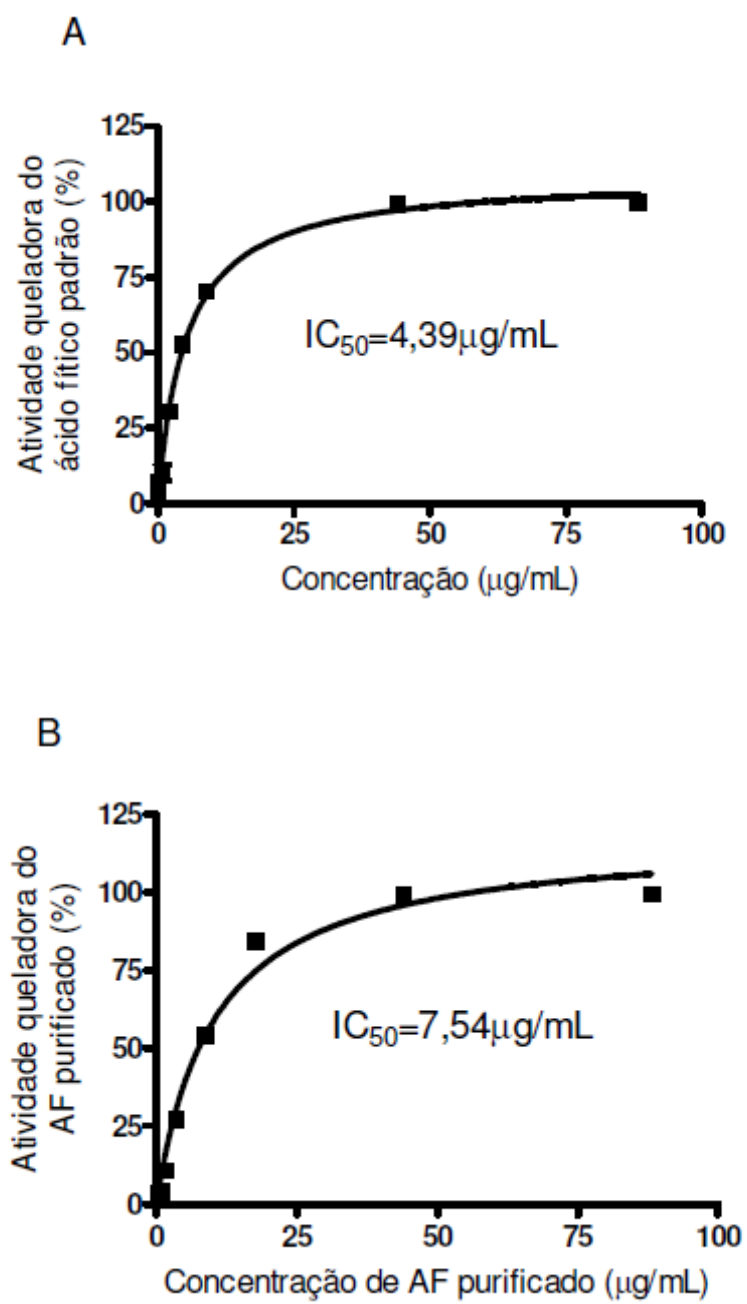


Figura 3

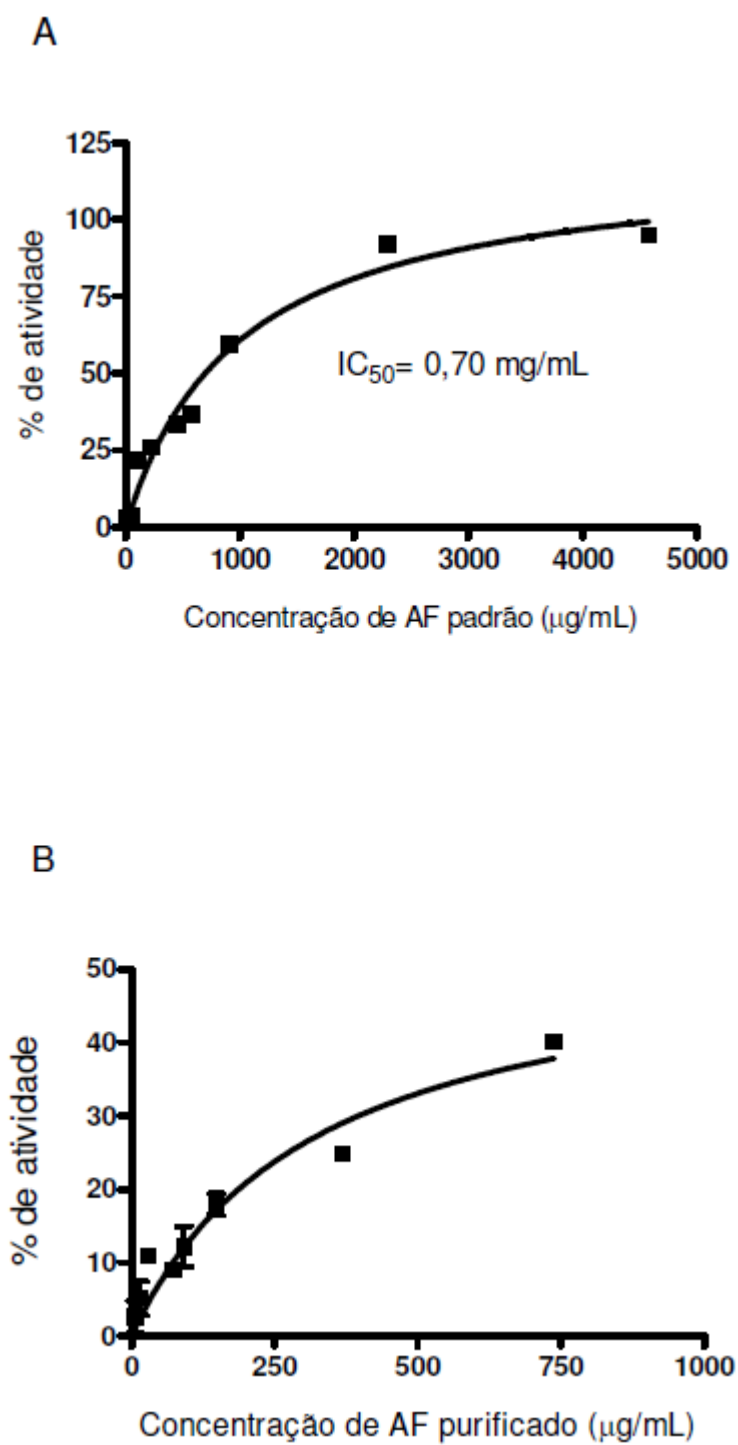


Figura 4

Normas para publicação

GERAL - Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS - Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato *.pdf*, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema *on line de QN*. A revista não aceita mais a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês. As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras simples e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior ver o item Material Suplementar. As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (*800 dpi/bitmap para traços*). No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm). Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de *QN* junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras.

A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. Colocar os títulos acima de cada tabela. No texto, deverá ser indicada apenas a inserção de cada um(a).

Referências

Revistas:

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada

revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho 79 73,771* **1979**. (CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *USpat.* *4,730,004* **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI* *9.604.468-3*, **1999**.

Livros:

com editor(es):

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997. **Material apresentado em Congressos:**

12. Ferreira, A. B.; Brito, S. L.; *Resumos da 20^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.s bq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

5.3 Artigo Científico 3: Ácido Fítico do Farelo de Arroz como Antioxidante em Carne Mecanicamente Separada (CMS) e Mortadela de Frango. Será submetido a Food Chemistry. As normas para publicação estão anexadas após o artigo.

Ácido Fítico do Farelo de Arroz como Antioxidante em Carne Mecanicamente Separada (CMS) e Mortadela de Frango

Atividade Antioxidante do Ácido Fítico em Carnes

Cristiane Canan ¹, Fernanda Delaroza ¹, Rubia Casagrande ², Cleonice Mendes Sarmiento³,
Massami Shimokomaki ¹, Elza Iouko Ida ^{1,*}

¹ Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Londrina, Paraná, Brasil

² Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Londrina, Paraná, Brasil

³ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento de Tecnologia em Alimentos, Medianeira, Paraná, Brasil

* Correspondência do autor. Fax: +55 43 33714080.

Email: elida@uel.br (Dr^a Elza Iouko Ida)

Abstract

The objective of this work was to investigate the antioxidant capacity of purified phytic acid (PA) from rice bran in mechanically deboned poultry meat (MDPM) and applied in combination with sodium erythorbate in mortadella. Purified PA and standard PA (Sigma) were applied in MDPM stored at -18°C for 120 days at 5mmol and 10mmol/kg concentrations and lipid oxidation and warmed-over flavor (WOF) was monitored at intervals of 15 days. A central composite rotational design (CCRD) was used to verify the influence of purified PA and sodium erythorbate in mortadella, lipid oxidation was evaluated after 30 days of storage at 30°C . Purified PA in MDPM reduced the lipid oxidation and WOF and in association to sodium erythorbate, a synergistic effect by inhibiting lipid oxidation was observed in mortadella although PA had a stronger antioxidant properties in relation to erythorbate.

Keywords: Phytic acid. Sodium erythorbate. Lipid oxidation. WOF. Mortadella.

1 Introdução

O ácido fítico é um antioxidante efetivo e economicamente viável por apresentar elevada capacidade quelante de íons metálicos multivalentes, especialmente ferro, zinco e cálcio. Ao formar um quelato com o ferro, o ácido fítico inativa sua ação catalítica e inibe a produção de radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) mediada pelo ferro (Graf & Eaton, 1985). O ácido fítico também se destaca pelo benefício à saúde na redução do nível de colesterol e hipertensão (Hasler, Kundrat, & Wool, 2000), tratamento de cálculo renal (Jenab & Thompson, 2002), diabetes (Lee, Park, Chun, Cho, Cho, & Lillehoj, 2006) e na inibição de câncer (Bode & Dong, 2000, Jenab & Thompson, 2000; Steer & Gibson, 2002; Verghese, Rao, Chawan, Walker, & Shackelford, 2006; Kumar, Sinha, Makkar, & Becker, 2010). A aplicação de 0,50% de ácido fítico de farelo de arroz adicionados na água de beber, após indução tumoral, reduziu o risco de câncer de cólon em ratos (Norazalina, Norhaizan, Hairuszah, & Norashareena, 2009).

A oxidação lipídica é um fator limitante na qualidade e aceitabilidade de carnes e produtos cárneos (Morrissey, Sheehy, Galvin, Kerry, & Buckley, 1998). Em produtos cárneos, o eritorbato de sódio é um dos antioxidante mais utilizados e capaz de prevenir o desenvolvimento da rancidez oxidativa quando aplicado em concentrações acima de 100 ppm (Gray & Pearson, 1987). É permitido o seu uso como antioxidante em produtos cárneos em quantidade suficiente para a obtenção da característica desejável e acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 1998). Em função do seu alto poder redutor, acelera a formação e estabiliza a cor de carnes curadas com nitrito (Counsell & Horning, 1981). Em diversos países o ácido fítico também é utilizado para prevenir a descoloração, inibir a oxidação lipídica, melhorar a qualidade nutritiva e prolongar a validade dos alimentos, porém no Brasil ele não é utilizado para este fim. O potencial antioxidante do ácido fítico purificado do germe de milho foi confirmado por Filgueiras, Casagrande, Soares, Shimokomaki, and Ida (2009) por meio de ensaios de deoxirribose e batofenantrolina.

Na indústria cárnea, a oxidação lipídica afeta principalmente a carne mecanicamente separada (CMS) ou carne mecanicamente desossada (CMD), que são termos genéricos utilizados à carne que permanece firmemente aderida aos ossos após a retirada dos cortes cárneos (Brasil, 2000). A rápida oxidação da CMS se deve à presença de gorduras insaturadas, incorporação de ar e grande parte da medula óssea que reduzem a qualidade da CMS armazenada sob congelamento por longos períodos (Field, 1988).

Em abatedouros de aves há uma elevada disponibilidade de CMS e um dos principais usos é sua utilização como matéria-prima em embutidos cárneos cozidos. Embutidos cárneos cozidos tipo mortadela podem conter até 60% de CMS (Brasil, 2000) e devido a sua composição são altamente suscetíveis a alterações de ordem físico-química e microbiológica que depreciam a sua qualidade (Mielnik, Aaby, & Skrede, 2003). Dentre as principais alterações está também a oxidação lipídica que é difícil de ser controlada, por sua complexidade e variabilidade. A utilização de antioxidantes é importante para amenizar os efeitos oxidativos indesejáveis e auxiliar na qualidade do produto durante sua vida útil (Olivo, 2006).

A indústria cárnea necessita melhorar a estabilidade da CMS e produtos cárneos que estão propensos a uma rápida oxidação e o estudo de novos ingredientes podem contribuir para que novas soluções sejam geradas para aumentar a vida útil e a qualidade dos mesmos. Uma alternativa segura seria a aplicação do ácido fítico como antioxidante. O objetivo deste trabalho foi investigar o poder antioxidante do ácido fítico purificado do farelo de arroz em CMS de frango e em combinação com eritorbato de sódio em mortadela de frango.

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

O ácido fítico do farelo de arroz integral foi purificado da cultivar IRGA 417 fornecido pelo Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA) de Cachoeirinha/RS da safra 2007/2008 a partir da extração com HCl 1 mol.L⁻¹ (1:10 p/v), 25 °C e agitação a 2 x g por 1 h, seguido de

ajuste de pHs, etapas de precipitação, filtração e secagem. O ácido fítico padrão utilizado foi o fitato de dodecassódio do arroz (Sigma, P0109, PM 923,82) com pureza > 90%. A CMS de frango e os ingredientes utilizados na elaboração da mortadela foram fornecidos por uma empresa abatedoura de aves da região Oeste do Paraná. Os demais reagentes utilizados nesta investigação foram de grau analítico de diferentes procedências comerciais.

2.2 Aplicação do ácido fítico purificado do farelo de arroz como antioxidante em CMS de frango

O ácido fítico padrão ou purificado do farelo de arroz foi adicionado na CMS de frango recém preparada no abatedouro. Foram utilizados dois lotes de CMS produzidos em dias diferentes. O lote 1 foi dividido em 5 amostras, sendo uma amostra controle (sem antioxidante), duas amostras com 5 mmol.L⁻¹ e 10 mmol.L⁻¹ de ácido fítico padrão por kg de CMS e outras duas amostras com 5 mmol.L⁻¹ e 10 mmol.L⁻¹ de ácido fítico purificado por kg de CMS. O lote 2 foi também dividido em 5 amostras e o preparo de amostra foi similar ao lote 1. Em seguida, 200 g de cada amostra foram colocados em placas de Petri de 100 x 200 mm e protegidas com filme de polietileno e armazenadas a -18 °C. Logo após a adição do ácido fítico (tempo zero), as amostras foram armazenadas por 120 dias e em intervalos de 15 dias foram analisados em triplicata, a oxidação lipídica conforme descrito no item 2.3 e determinação do aroma de requentado conforme o item 2.4.

2.3 Medida de oxidação lipídica

A oxidação lipídica foi determinada pelo índice de TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), utilizando 10 g de amostra segundo a metodologia descrita por Tarladgis, Pearson, and Dugan (1964) e modificado por Crackel, Gray, Booren, and Buckely (1988). Para as amostras de mortadela seguiu-se as recomendações de Shahidi, Rubin,

Diosady, and Wood (1985) no que se refere a adição de sulfanilamida para as amostras que contêm nitrito. Os resultados foram expressos como mg de TBARS/kg de amostra.

2.4 Determinação do aroma de requentado

O aroma de requentado ou WOF (*Warmed-Over Flavor*) foi determinado com 10 gramas de amostra. As amostras foram embaladas em sacos de polietileno e aquecidas em banho-maria fervente por 15 min ou até atingir a temperatura interna de 75 ± 5 °C, conforme procedimento descrito por Igene and Person (1979). Em seguida, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e armazenadas por 48 h sob refrigeração a 6 ± 1 °C com luz fluorescente. Após este período, as amostras foram novamente aquecidas em banho-maria fervente por 15 min ou até atingir temperatura interna de 75 ± 5 °C. As amostras foram resfriadas até atingirem a temperatura ambiente e o WOF foi medido em triplicata e os resultados expressos como mg de TBARS/kg de amostra.

2.5 Avaliação do ácido fítico e eritorbato de sódio na estabilidade oxidativa de mortadela

2.5.1 Preparo da Mortadela

Para elaboração da mortadela foram utilizadas as seguintes matérias-primas e ingredientes: CMS de frango (60%), carne de frango (10%), pele de frango (10%), sal (1,8%), fécula de mandioca (3%), proteína texturizada de soja em pó (4%), gelo (10,43%), condimentos (0,52%) e nitrato/nitrito de sódio (0,25%). O ácido fítico purificado, o ácido fítico padrão e o eritorbato de sódio foram adicionados juntamente com os demais aditivos de cada formulação nas quantidades estabelecidas no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (Tabela 3). As formulações de mortadela foram elaboradas utilizando 60% de CMS de aves como limite máximo permitido neste produto (Brasil, 2000).

O preparo da massa foi realizado em um *cutter* com capacidade de 30 kg. A massa foi considerada pronta quando atingido o aspecto de "liga". Para o embutimento, foi utilizada

tripa artificial de calibre 70 mm. O cozimento foi realizado em estufa automática (modelo Unimatic 1000, marca Eller, Merano, Itália) em quatro etapas, sendo três de 30 min, a primeira a 50 °C, a segunda a 60 °C e a terceira a 70 °C e na quarta etapa, a temperatura foi mantida a 80 °C até a temperatura interna da mortadela atingir 74 °C. A umidade relativa utilizada no cozimento foi de 95%. Após o cozimento, foi realizado o choque térmico por 15 min com água a temperatura ambiente na própria estufa de cozimento.

2.5.2 Delineamento Experimental

Foram realizados dois DCCR, cada um com duas variáveis independentes, três pontos centrais e quatro pontos axiais, totalizando 11 ensaios em cada delineamento. Os níveis das variáveis independentes X_E (eritorbato de sódio), X_P (ácido fítico padrão) e X_F (ácido fítico purificado) foram selecionados com base na Portaria n.1004 de 11 de dezembro de 1998 (Brasil, 1998). Os ensaios para elaboração das mortadelas foram realizados aleatoriamente e posteriormente, mantidas a 30 °C em estufa tipo BOD (modelo TE-391, marca TECNAL, São Paulo, Brasil) por 30 dias. As amostras foram avaliadas em triplicata para avaliação da oxidação lipídica. A Tabela 3 apresenta a matriz do DCCR com seus níveis de variação, respostas experimentais (Y_P e Y_F) e estimadas (\hat{Y}_P e \hat{Y}_F), expressas como mg de TBARS/kg de mortadela. Os modelos propostos foram expressos conforme a Equação 1 e Equação 2.

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_E x_E + \beta_D x_D + \beta_{EE} x_E^2 + \beta_{DD} x_D^2 + \beta_{ED} x_E x_D + \varepsilon \quad \text{Equação 1}$$

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_E x_E + \beta_F x_F + \beta_{EE} x_E^2 + \beta_{FF} x_F^2 + \beta_{EF} x_E x_F + \varepsilon \quad \text{Equação 2}$$

onde:

\hat{y} = função-resposta

x_E, x_P e x_F = variáveis codificadas

β 's = coeficientes estimados pelo modelo de superfície de resposta

e = resíduo (erro experimental)

2.2.5 Análises Estatísticas

para avaliação do ácido fítico purificado como antioxidante em CMS foi utilizado a ANOVA de uma via seguido do teste-t de comparações múltiplas de Bonferroni (Programa GraphPad Prism, Versão 4.00, 2003). Foi utilizado o *software* STATISTICA 7.0 para análise de regressão e variância e curvas de contorno utilizando o DCCR para a mortadela (STATSOFT, 2004). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e considerado significativamente diferente quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Aplicação do ácido fítico purificado como antioxidante em CMS de frango

A oxidação lipídica na CMS controle não diferiu ($p > 0,05$) até 75 dias de armazenamento a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ em relação ao tempo zero (Tabela 1). Na CMS controle com 90, 105 e 120 dias de armazenamento, a oxidação lipídica aumentou gradativamente e apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$). Em 90 dias de armazenamento ocorreu um aumento de 220% indicando que neste período a CMS já estava oxidada. Porém, a legislação brasileira estabelece o prazo de validade da CMS de frango de 90 dias quando armazenada a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ e sem adição de aditivos (Brasil, 2000).

A oxidação lipídica na CMS adicionada de 5 e 10 mmol.L^{-1} de ácido fítico padrão ou 10 mmol.L^{-1} de ácido fítico purificado não diferiu significativamente até 90 dias de armazenamento a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ (Tabela 1), indicando que o ácido fítico padrão ou purificado atuaram como antioxidante. Portanto, a adição do ácido fítico na CMS poderia ser recomendada para atender o prazo de validade conforme a legislação brasileira. Em

frigoríficos, a oxidação lipídica é uma das causas primárias da perda de qualidade de CMS durante a estocagem a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O WOF da CMS de frango adicionadas de 5 e 10 mmol.L^{-1} de ácido fítico padrão ou purificado foi inibido em mais de 47% e diferiu significativamente ($p < 0,05$) da CMS controle no tempo zero (Tabela 2). O WOF da CMS com adição de 5 mmol.L^{-1} e 10 mmol.L^{-1} de ácido fítico padrão não diferiu significativamente ($p < 0,05$) até 45 dias de armazenamento em relação ao tempo zero. Enquanto que o WOF em 60 e 75 dias de armazenamento da CMS com ácido fítico padrão manteve-se estável, porém a partir de 90 dias de armazenamento ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$). Entretanto, nota-se que após 120 dias de armazenamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ o WOF da CMS com ácido fítico padrão nas duas concentrações investigadas não foi superior ao WOF da CMS controle no tempo zero.

O WOF da CMS com adição de 5 mmol.L^{-1} de ácido fítico não diferiu significativamente ($p > 0,05$) até 45 dias de armazenamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ em relação ao tempo zero. Enquanto que em 60, 75 e 90 dias de armazenamento o WOF manteve-se estável e a partir de 105 dias de armazenamento ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$). Na CMS com 10 mmol.L^{-1} de ácido fítico purificado não houve diferença significativa ($p > 0,05$) até 75 dias de armazenamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ em relação ao tempo zero. Porém, a partir de 90 dias de armazenamento o WOF aumentou significativamente ($p < 0,05$) e aos 105 dias de armazenamento o WOF foi inferior ao valor de WOF na CMS controle no tempo zero. Portanto, a adição de ácido fítico padrão ou purificado nas concentrações investigadas reduziu significativamente ($p < 0,05$) o desenvolvimento de WOF em relação a CMS controle em todos os tempos de armazenamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Assim, comprova-se novamente que o ácido fítico inibiu a oxidação lipídica em CMS de frango. O aumento da concentração do ácido fítico padrão ou purificado de 5 mmol.L^{-1} para 10 mmol.L^{-1} também confirmou um maior efeito antioxidante. Em estudos realizados por Soares, Olivo, Shimokomaki, and Ida (2004) observaram que a adição de 2 mmol.L^{-1} de ácido fítico/kg de filés de peito de frango, como

antioxidante complementar em filés suplementados com vitamina E apresentou sinergismo e reduziu o WOF em até 95,3% por 5 dias sob armazenamento a 6 °C.

O uso de CMS é permitido somente em produtos cárneos cozidos e que em geral para venda são estocados sob condições de refrigeração. O desenvolvimento de WOF é um fator limitante na validade do alimento, pois caracteriza o desenvolvimento de aromas oxidados em carnes cozidas refrigeradas, em que a rancidez torna-se aparente dentro de 48 h sob refrigeração. O desenvolvimento de WOF é catalisado pelos íons Fe^{2+} provenientes da mioglobina, que nos processos de trituração para elaboração da CMS e no cozimento, é parcialmente destruída liberando estes íons (Gray & Person, 1984). Portanto, o ácido fítico aplicado como antioxidante atuou como quelante dos íons Fe^{2+} e impediu a sua ação como catalizador da oxidação lipídica, desta forma, recomenda-se a adição de ácido fítico durante o preparo da CMS para impedir o desencadeamento das reações oxidativas.

3.2 Avaliação do ácido fítico e eritorbato de sódio na estabilidade oxidativa da mortadela

A Tabela 3 apresenta a resposta experimental (Y_P) e estimada (Y_P) pelo modelo de avaliação do eritorbato de sódio e ácido fítico padrão na estabilidade oxidativa da mortadela. Os coeficientes de regressão (Tabela 4) das variáveis X_E (eritorbato de sódio) e X_P (ácido fítico padrão) e a interação $X_E X_P$ apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$). Na Tabela 3 estão apresentadas também, a resposta experimental (Y_F) e estimada (Y_F) pelo modelo de avaliação do eritorbato de sódio e ácido fítico purificado na estabilidade oxidativa da mortadela. Os coeficientes de regressão (Tabela 5) das variáveis X_E (eritorbato de sódio) e X_F (ácido fítico purificado) e a interação $X_E X_F$ também apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$). Assim, foi possível obter dois modelos matemáticos preditivos (Equação 3 e Equação 4) com as variáveis codificadas de respostas significativas.

$$\hat{Y} = -0,0179x_E - 0,0221x_P + 0,0090x_E^2 + 0,0152x_P^2 + 0,0073x_E x_P + 0,0158 \quad (\text{Equação 3})$$

$$\hat{Y} = -0,0153x_E - 0,0234x_F + 0,0061x_E^2 + 0,0141x_F^2 + 0,0090x_E x_F + 0,0199 \quad (\text{Equação 4})$$

O efeito das variáveis de X_E (eritorbato de sódio) e X_P (ácido fítico padrão) ou X_E (eritorbato de sódio) e X_F (purificado) foi avaliado sobre a oxidação lipídica em mortadela. Os coeficientes de regressão (Tabela 4 e Tabela 5) indicaram que o ácido fítico padrão ou purificado apresentaram maior efeito na redução da oxidação lipídica comparado com o eritorbato de sódio. A ANOVA (Tabela 6) confirma que os modelos ajustaram-se adequadamente aos dados experimentais. Considerando o F_{Tabelado} de 2,57 para os dois modelos e o $F_{\text{calculado}}$ de 689,65 e de 478,02 observa-se que o $F_{\text{calculado}}$ foi de 268,34 e 186,00 vezes superior ao F_{Tabelado} , respectivamente. Segundo Barros Neto, Scarminio e Bruns (1995), quando o $F_{\text{calculado}}$ é no mínimo 4 a 5 vezes o valor de F_{Tabelado} assegura-se que a regressão foi significativa e o modelo é útil para fins preditivos.

Considerando que a regressão foi significativa (Tabela 6) foi possível construir as curvas de contorno (Figura 1 e Figura 2), nas quais observa-se que há uma região para a menor oxidação lipídica na faixa de combinações de concentração de eritorbato de sódio entre 25,0 - 50,00 mmol.L⁻¹ e ácido fítico padrão ou purificado entre 5,0 - 9,0 mM. De acordo com Rodrigues & Iemma (2005) a indicação de uma faixa ótima das variáveis é mais interessante do que quando há apenas um valor pontual, visto que se pode admitir uma variação nas concentrações das variáveis estudadas ao redor dos valores ótimos, mantendo-se ainda, o processo na condição otimizada.

O ácido fítico padrão ou purificado (Tabela 3) quando empregados isoladamente na mortadela (ensaios 5) apresentaram efeito inibitório na oxidação lipídica de 21,14 e 30,17% se comparado à mortadela na qual adicionou-se somente o eritorbato de sódio (ensaio 7), respectivamente. A capacidade antioxidante do ácido fítico foi avaliado por Lee & Hendricks (1995) que aplicaram o ácido fítico em carne homogeneizada e compararam com o ascorbato,

BHT e EDTA em diferentes concentrações e pH e observaram que o ácido fítico foi o mais efetivo na inibição da peroxidação lipídica. Esta capacidade antioxidante do ácido fítico foi provavelmente devido a remoção do íon ferro da mioglobina que preveniu a autooxidação lipídica e formação de *off-flavors*.

As interações $X_E X_P$ e $X_E X_F$ (Tabela 4 e Tabela 5) indicaram que ocorreu um efeito sinérgico do ácido fítico e eritorbato de sódio na inibição da oxidação lipídica na mortadela. O uso de ácido fítico como aditivo alimentar na concentração de 0,1 a 5,0 mmol.L⁻¹ para 90 g de amostra foi avaliado quanto a capacidade antioxidante em homogenatos de carnes bovina ou suína crus ou cozidos e estocadas por três dias a 4 °C por Stodolak, Starzynska, Czyszczonek, and Zyla (2007), e observaram que a estabilidade de carnes especialmente as cozidas foi prolongada.

No desenvolvimento da mortadela foi utilizada a concentração de 0,25% de uma mistura comercial de nitrato e nitrito em todas as formulações do DCCR. A utilização destes sais é característica em produtos cárneos curados cozidos com o objetivo de conferir aroma e cor avermelhada. Utilizados principalmente como conservantes para impedir o desenvolvimento do *Clostridium botulinum* e também podem atuar como antioxidantes em doses iguais ou superiores a 50 ppm (Gray & Person, 1987). Seu uso é regulamentado pela Legislação Brasileira (Brasil, 1998; Brasil, 2007) e o efeito tóxico mais relevante da presença de nitrato e nitrito é a formação de nitrosaminas que são potentes agentes cancerígenos. O eritorbato quando utilizado em produtos cárneos curados tem como função além de antioxidante, inibir a formação de nitrosaminas (Rahman, 2007).

Em salame tipo Milano e em mortadela a capacidade antioxidante do ácido fítico foi avaliada por Ghiretti et al. (1997) e observaram que os vários antioxidantes testados como ascorbato de sódio, catequina, sesamo e ácido fítico apresentaram diferentes modos de ação sobre a oxidação lipídica. No salame tipo Milano com ácido fítico armazenamento por 5 meses o índice de TBARS foi igual ou inferior ao controle (sem ácido fítico). Entretanto, em mortadelas não houve diferenças significativas entre o controle e os produtos contendo ácido

fítico. Porém, considerando os resultados obtidos neste trabalho que confirmaram a alta capacidade antioxidante do ácido fítico purificado e seu efeito sinérgico na inibição da oxidação lipídica em mortadela, pode-se recomendar o seu uso como substituto parcial do eritorbato de sódio.

4. Conclusão

O ácido fítico purificado em CMS de frango reduziu a oxidação lipídica e aroma de requentado (WOF). O ácido fítico purificado em mortadela apresentou maior efeito na redução da oxidação lipídica e quando em combinação com o eritorbato de sódio apresentou um efeito sinérgico na inibição oxidativa.

Referências

- Barros Neto, B., Scarminio, I. S., & Bruns, R. E. (1995). *Planejamento e otimização de experimentos*. 2 ed. Campinas: Ed. UNICAMP.
- Bode, A. M., & Dong, Z. (2000). Signal transduction pathways: targets for chemoprevention of skin cancer. *The Lancet Oncology*, 1, 181-188.
- Brasil (1998). Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilâncias Sanitária. Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998, que aprova o Regulamento Técnico: "Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos", constante do Anexo desta Portaria. Publicada no Diário Oficial da União em 14 de dezembro de 1998.
- Brasil (2000). Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilâncias Sanitária. Instrução Normativa n. 4, de 31 de março de 2000, que aprova os Regulamentos Técnicos de

Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. Publicada no Diário Oficial da União em 05 de abril de 2000.

Brasil (2007). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 29 de dezembro de 2006. Regulamento técnico de atribuição de aditivos e seus limites das seguintes categorias de alimentos: Grupo 8 - Carnes e produtos cárneos. Publicada no Diário Oficial da União em 04 de janeiro de 2007.

Counsell, J. N., & Hornig, D. H. (1981). *Vitamin C (ascorbic acid)*. England: Applied Science.

Crackel, R. L., Gray, J. I., Booren, A. M., & Buckely, D. J. (1988). Effect of antioxidants on lipid stability in restructured beef steaks. *Journal of Food Science*, 53, 656-657.

Field, R. A. (1988). Mechanically separated meat, poultry and fish. In: PEARSON, A. M., DUTSON, T. R. In: *Edible meat by-products: advances in meat research*. London: Elsevier Applied Science.

Filgueiras, C. T., Casagrande, R., Soares, A. L., Shimokomaki, M., & Ida, E. I. (2009). Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho. *Química Nova*, 32(7), 1787-1791.

Ghiretti, G. P., Zanardi, E., Novelli, G., Campanini, G., Dazzi, G., Madarena, G., & Chizzolini, R. (1997). Comparative evaluation of some antioxidants in salame milano and mortadella production. *Meat Science*, 47(1-2), 167-176.

- Graf, E., & Eaton, J. W. (1985). Dietary suppression of colonic cancer: fiber or phytate? *Cancer*, 56, 717-718.
- Gray, J. I., & Pearson, A. M. (1984). Cured meat flavor. *Advances in Food Research*, 29, 1-86.
- Gray, J. I., & Pearson, A. M. (1987). Rancidity and warmed over flavor. In: *Advances in Meat Research*, vol.3, New York: AVI Book.
- Hasler, C. M., Kundrat, S., & Wool, D. (2000). Functional foods and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Report*, 2, 467-475.
- Igene, J. O., & Pearson, A. M. (1979). Role of phospholids and triglycerides in warmed-over flavor development in meat model systems. *Journal of Food Science*, 44, 1285-1290.
- Jenab, M., & Thompson, L. U. (2002). Role of phytic acid in cancer and other Diseases. In: REDDY, N. R., SATHE, S. K. *Food Phytates*, Florida: CRC Press.
- Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2010). Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, 120, 945-959.
- Lee, B. J., & Hendricks, D. G. (1995). Phytic acid protective effect beef round muscle lipid peroxidation. *Journal of Food Science*, 60(2), 241-244.
- Lee, S. H., Park, H. J., Chun, H. K., Cho, S. Y., Cho, S. M., & Lillehoj, H. S. (2006). Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice. *Nutrition Research*, 26, 474-479.

- Mielnik, M. B., Aaby, K., & Skrede, G. (2003). Commercial antioxidants control lipid oxidation in mechanically deboned turkey meat. *Meat Science*, *65*, 1147-1155.
- Morrissey, P. A., Sheehy, P. J. A., Galvin, K., Kerry, J. P., & Buckley, D. J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, *49*, S73-S86.
- Norazalina, S., Norhaizan, M. E., Hairuszah, I., & Norashareena, M. S. (2009). Anticarcinogenic efficacy of phytic acid extracted from rice bran on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *62*(3), 259-268.
- Olivo, R. (2006). Atualidades na qualidade da carne de aves. In: Olivo, R., & Olivo, N. *O mundo das carnes. Ciência, Tecnologia & Mercado*. São Paulo: Varela.
- Rahman, M. S. (2007). Nitrites in food preservation. In: Rahman, M. S. *Handbook of Food Preservation*. Boca Raton: CRC Press.
- Rodrigues, M. I., & lemma, A. F. (2005). *Planejamento de experimentos*. 1 ed. Campinas: Casa do Pão Editora.
- Shahidi, F., Rubin, L. J., Diosady, L. L., & Wood, D. F. (1985). Effect of sulphanilamide on the TBA values of cured meats. *Journal Food Science*, *50*, 274-275.
- Soares, A. L., Olivo, R., Shimokomaki, M., & Ida, E. I. (2004). Synergism between dietary vitamin E and exogenous phytic acid in prevention of warmed-over flavour development in chicken breast meat, Pectoralis major M. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *47*, 57-62.

Statsoft Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software), version 7. Tulsa, Oklahoma, USA.

Steer, T. E., & Gibson, G. R. (2002). The microbiology of phytic acid metabolism by gut bacteria and relevance for bowel cancer. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 783-790.

Stodolak, B., Starzynska, A., Czyszczon, M., & Zyla, K. (2007). The effect of phytic acid on antioxidant stability of raw and cooked meat. *Food Chemistry*, 101, 1041-1045.

Tarladgis, B. G., Pearson, A. M., & Dugan, L. R. (1964). Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods - II. Formation of the TBA-malonaldehyde complex without acid-heat treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15, 602-607.

Vergheese, M. Rao, D. R., Chawan, C. B., Walker, L. T., & Shackelford, L. (2006).

Anticarcinogenic effect of phytic acid (IP6): Apoptosis as a possible mechanism of action. *Food Science and Technology*, 39, 1093-1098.

Legenda das Figuras

Figura 1. Curvas de contorno para oxidação lipídica (mg de TBARS/kg de mortadela) utilizando eritorbato de sódio (X_E) e ácido fítico padrão (X_P).

Figura 2. Curvas de contorno para oxidação lipídica (mg de TBARS/kg de mortadela) utilizando eritorbato de sódio (X_E) e ácido fítico purificado do farelo de arroz (X_F).

Figura 1

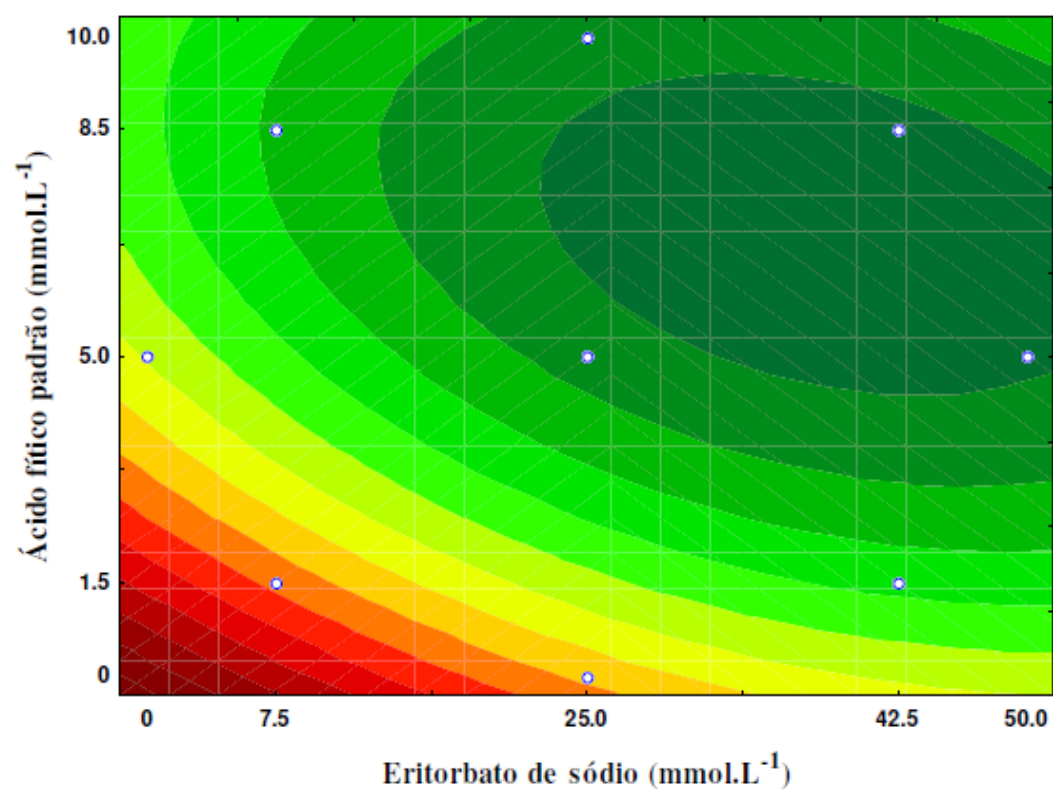


Figura 2

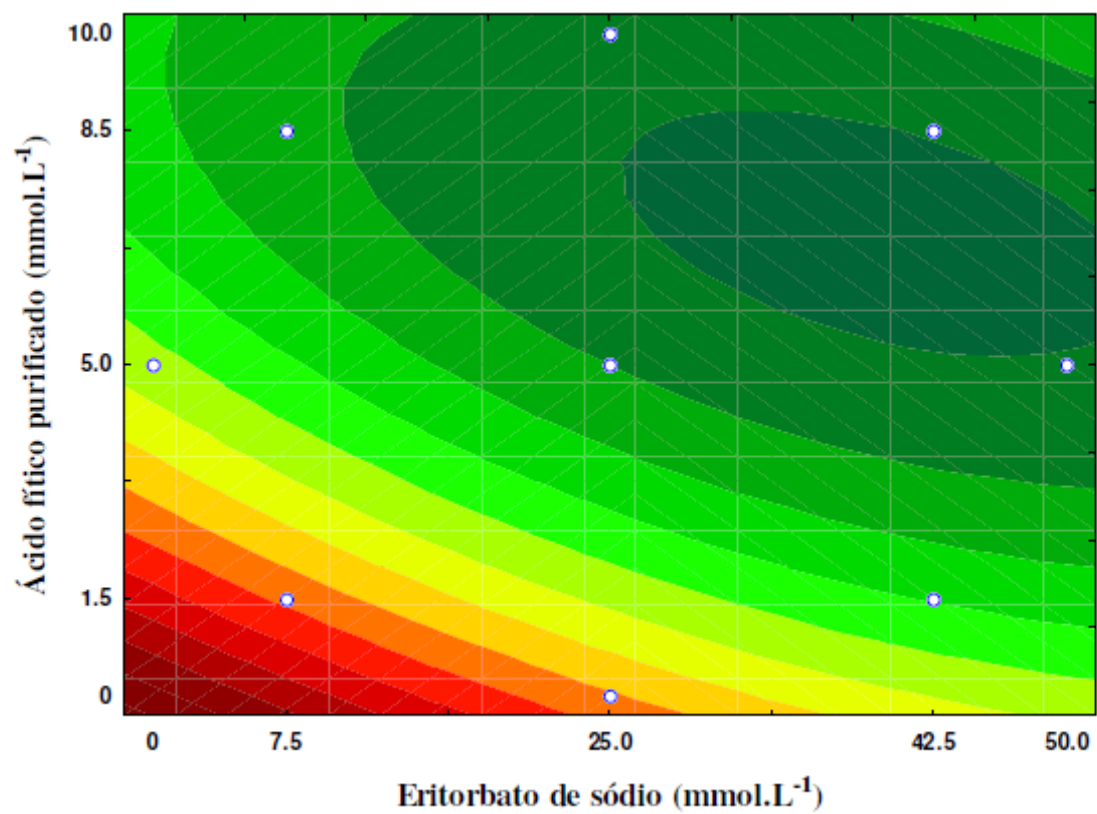


Tabela 1 – Avaliação da oxidação lipídica em CMS de frango com adição de diferentes teores de ácido fítico padrão ou ácido fítico purificado do farelo de arroz armazenadas a -18°C

Dias	mg de TBARS/kg de CMS de frango				
	Controle	5 mmol.L ⁻¹ de ácido fítico padrão	10 mmol.L ⁻¹ de ácido fítico padrão	5 mmol.L ⁻¹ de ácido fítico purificado	10 mmol.L ⁻¹ de ácido fítico purificado
0	0,211 ^{Da} (± 0,0433)	0,180 ^{Ca} (± 0,0131)	0,158 ^{Ca} (± 0,0088)	0,203 ^{Da} (± 0,0262)	0,178 ^{CDa} (± 0,0100)
15	0,140 ^{Da} (± 0,0155)	0,126 ^{CDa} (± 0,0097)	0,144 ^{CDa} (± 0,0116)	0,124 ^{Da} (± 0,0039)	0,149 ^{CDa} (± 0,0221)
30	0,153 ^{Da} (± 0,0245)	0,101 ^{Da} (± 0,0080)	0,096 ^{DEa} (± 0,0157)	0,140 ^{Da} (± 0,0091)	0,112 ^{Da} (± 0,0130)
45	0,168 ^{Dab} (± 0,0069)	0,102 ^{Dab} (± 0,0281)	0,072 ^{Eb} (± 0,0053)	0,187 ^{Dab} (± 0,0327)	0,151 ^{CDab} (± 0,0239)
60	0,202 ^{Da} (± 0,0198)	0,151 ^{CDb} (± 0,0079)	0,148 ^{CDb} (± 0,0045)	0,177 ^{Dab} (± 0,0049)	0,156 ^{CDb} (± 0,0083)
75	0,180 ^{Dab} (± 0,0139)	0,173 ^{Cab} (± 0,0066)	0,143 ^{CDb} (± 0,0072)	0,180 ^{Dab} (± 0,0108)	0,181 ^{CDa} (± 0,0079)
90	0,576 ^{Ca} (± 0,0514)	0,158 ^{CDb} (± 0,0064)	0,151 ^{Cb} (± 0,0077)	0,387 ^{Ca} (± 0,0668)	0,204 ^{Cb} (± 0,0216)
105	1,442 ^{Ba} (± 0,0098)	0,267 ^{Bd} (± 0,0081)	0,248 ^{Bd} (± 0,0065)	0,960 ^{Bb} (± 0,0571)	0,546 ^{Bc} (± 0,0262)
120	2,235 ^{Aa} (± 0,0457)	0,923 ^{Ad} (± 0,0170)	0,518 ^{Ae} (± 0,0240)	1,311 ^{Ab} (± 0,0384)	1,162 ^{Ac} (± 0,0191)

Valores com letras diferentes (a-e) na mesma linha e (A-E) na mesma coluna diferem significativamente (p<0,05). Os resultados estão representados pela média ± EPM (n=6).

Tabela 2 – Avaliação de WOF em CMS de frango com adição de diferentes teores de ácido fítico padrão ou ácido fítico purificado do farelo de arroz armazenadas a -18 °C

Dias	mg de TBARS / CMS de frango				
	Controle	5 mmol.L ⁻¹ de ácido fítico padrão	10 mmol.L ⁻¹ de ácido fítico padrão	5 mmol.L ⁻¹ de ácido fítico purificado	10 mmol.L ⁻¹ de ácido fítico purificado
0	2,102 ^{CDa} (± 0,0750)	0,502 ^{EFc} (± 0,0138)	0,172 ^{Ed} (± 0,0203)	0,831 ^{DEb} (± 0,0330)	0,530 ^{DEFc} (± 0,0573)
15	1,432 ^{Ca} (± 0,1960)	0,430 ^{FGcd} (± 0,0199)	0,255 ^{DEd} (± 0,0366)	0,682 ^{Eb} (± 0,0646)	0,511 ^{EFbc} (± 0,0506)
30	2,399 ^{Da} (± 0,1285)	0,341 ^{Gc} (± 0,0108)	0,166 ^{Ed} (± 0,0195)	0,987 ^{Db} (± 0,0307)	0,352 ^{Fc} (± 0,0142)
45	2,305 ^{Da} (± 0,1331)	0,386 ^{FGc} (± 0,0174)	0,205 ^{Ed} (± 0,0076)	0,914 ^{DEb} (± 0,0873)	0,438 ^{EFc} (± 0,0156)
60	2,811 ^{BDa} (± 0,0783)	0,706 ^{CDc} (± 0,0181)	0,338 ^{Dd} (± 0,0117)	1,382 ^{Cb} (± 0,0649)	0,712 ^{CDc} (± 0,0338)
75	2,792 ^{Da} (± 0,0448)	0,614 ^{DEc} (± 0,0149)	0,353 ^{Dd} (± 0,0085)	1,537 ^{Cb} (± 0,0323)	0,633 ^{CDEc} (± 0,0279)
90	2,619 ^{Da} (± 0,0365)	0,758 ^{Cc} (± 0,0599)	0,645 ^{Cc} (± 0,0380)	1,663 ^{Cb} (± 0,0575)	0,810 ^{Cc} (± 0,0331)
105	3,493 ^{Ba} (± 0,1358)	1,710 ^{Bc} (± 0,0478)	1,521 ^{Bc} (± 0,0332)	2,461 ^{Bb} (± 0,0970)	1,859 ^{Bc} (± 0,1098)
120	4,635 ^{Aa} (± 0,2061)	1,988 ^{Acd} (± 0,0279)	1,762 ^{Ad} (± 0,0226)	3,348 ^{Ab} (± 0,0790)	2,364 ^{Ac} (± 0,0521)

Valores com letras diferentes (a-d) na mesma linha e (A-G) na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). Os resultados estão representados pela média \pm EPM (n=6).

Tabela 3 – Matriz dos ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) com as variáveis independentes e resposta experimental e estimada para a oxidação lipídica em mortadela

Ensaio	Codificado (Real)		mg de TBARS/kg de mortadela			
	Eritorbato de sódio (mmol.L ⁻¹)	Ácido fítico padrão ou purificado (mmol.L ⁻¹)	Eritorbato de sódio e ácido fítico padrão	Eritorbato de sódio e ácido fítico purificado		
	X_E	X_P ou X_F	Y_P^*	\hat{Y}_P	Y_F^*	\hat{Y}_F
1	-1 (7,5)	-1 (1,5)	0,086 (± 0,0014)	0,087	0,087 (± 0,0007)	0,088
2	1 (42,5)	-1 (1,5)	0,026 (± 0,0006)	0,028	0,020 (± 0,0006)	0,023
3	-1 (7,5)	1 (8,5)	0,038 (± 0,0003)	0,037	0,041 (± 0,0013)	0,039
4	1 (42,5)	1 (8,5)	0,007 (± 0,0008)	0,007	0,010 (± 0,0000)	0,010
5	-1,414 (0)	0 (5,0)	0,061 (± 0,0022)	0,059	0,056 (± 0,0000)	0,054
6	1,414 (50,0)	0 (5,0)	0,008 (± 0,0004)	0,008	0,009 (± 0,0050)	0,011
7	0 (25,0)	-1,414 (0)	0,077 (± 0,0036)	0,077	0,080 (± 0,0049)	0,081
8	0 (25,0)	1,414 (10,0)	0,016 (± 0,0006)	0,015	0,017 (± 0,0017)	0,015
9	0 (25,0)	0 (5,0)	0,017 (± 0,0019)	0,016	0,020 (± 0,0003)	0,020
10	0 (25,0)	0 (5,0)	0,015 (± 0,0011)	0,016	0,019 (± 0,0014)	0,020
11	0 (25,0)	0 (5,0)	0,016 (± 0,0007)	0,016	0,021 (± 0,0007)	0,020

Y_P (resposta experimental) e \hat{Y}_P (resposta estimada) do DCCR utilizando as variáveis X_E (eritorbato de sódio) e X_P (ácido fítico padrão); Y_F (resposta experimental) e \hat{Y}_F (resposta estimada) do DCCR utilizando as variáveis X_E (eritorbato de sódio) e X_P (ácido fítico purificado). *Médias ± EPM (n=3 repetições).

Tabela 4 – Coeficientes de regressão para a resposta YP = mg de TBARSs/kg de mortadela

Fonte de variação	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (27)	p – valor
Média	0,0158	0,0009	17,5418	0,0000*
(X _E) Eritorbato de sódio (L)	-0,0179	0,0006	-32,3412	0,0000*
(X _E) Eritorbato de sódio (Q)	0,0090	0,0007	13,6222	0,0000*
(X _P) Ácido fítico padrão (L)	-0,0221	0,0006	-39,9509	0,0000*
(X _P) Ácido fítico padrão (Q)	0,0152	0,0007	23,0887	0,0000*
(X _E) x (X _P)	0,0073	0,0008	9,3580	0,0000*

*p<0,05 considerados significativos

Tabela 5 – Coeficientes de regressão para a resposta YF = mg de TBARS/kg de mortadela

Fonte de variação	Coefficientes de Regressão	Erro Padrão	T (27)	p – valor
Média	0,0199	0,0010	18,9414	0,0000*
(X _E) Eritorbato de sódio (L)	-0,0153	0,0006	-23,7653	0,0000*
(X _E) Eritorbato de sódio (Q)	0,0061	0,0008	8,0438	0,0000*
(X _F) Ácido fítico purificado (L)	-0,0234	0,0006	-36,3637	0,0000*
(X _F) Ácido fítico purificado (Q)	0,0141	0,0008	18,4590	0,0000*
(X _E) x (X _F)	0,0090	0,0009	9,8760	0,0000*

*p<0,05 considerados significativos

Tabela 6 – ANOVA dos modelos quadráticos para avaliação da oxidação lipídica em mortadela

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F _{calculado}
Eritorbato de sódio e ácido fítico padrão				
Regressão	0,0253	5	0,0051	689,65
Resíduos	0,0002	27	0,0000	
Falta de ajuste	3,7 E-05			
Erro puro	1,6 E-04			
R ²	0,9919			
Eritorbato de sódio e ácido fítico purificado				
Regressão	0,0237	5	0,0048	478,02
Resíduos	0,0003	27	0,0000	
Falta de ajuste	6,9 E-05			
Erro puro	2,0 E-4			
R ²	0,9886			

Normas para publicação

Guide for Authors

Submission of Papers

All manuscripts for Food Chemistry should be submitted online via EES - Elsevier Editorial System -<http://ees.elsevier.com/foodchem> . This is the preferred method of submission, and facilitates processing of your manuscript. Only in exceptional cases where the authors have no electronic facilities whatsoever, the author should submit one original copy of the manuscript, plus two photocopies and a copy on disk, to the Managing Editor:

Authors are required to submit, with their manuscripts, the names and full contact details (including email address) of 3 potential referees (who should not come from the same institute). It is the author's responsibility to ensure that papers are written in clear and comprehensible English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. English language help service: Upon request, Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact authorsupport@elsevier.com for further information.

Submission of a paper implies that it has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Types of Contributions

Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; viewpoints; letters to the Editor; book reviews.

1. *Research papers* - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).

2. *Review articles* - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).

3. *Rapid communications* - an original research paper reporting a major scientific result or finding with significant implications for the research community, designated by the Editor.

4. *Short communications* - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication.

5. *Viewpoints* - Authors may submit viewpoints of about 1200 words on any subject covered by the Aims and Scope.

6. *Letters to the Editor* - Letters are published from time to time on matters of topical interest.

7. *Book reviews*

Manuscript Preparation

General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins on one side of white paper. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards

of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.

Abstracts: Each paper should be provided with an abstract of 100-150 words, reporting concisely on the purpose and results of the paper.

Text: Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

Units: The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10^9 in America, 10^{12} in Europe) is ambiguous and should not be used.

Symbols: Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full. Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity.

The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. No more than 30 references should be cited in your manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

References should be given in the following form:

Ahmed, I. A., & Robinson, R. K. (1999). The ability of date extracts to support the production of aflatoxins. *Food Chemistry*, 66(3), 307-312.

Marasas, W. F. O. (1996). Fumonisin: History, worldwide occurrence and impact. In L. S. Jackson, J. W. DeVries, & L. B. Bullerman, *Fumonisin in food, advances in experimental medicine and biology*, vol. 392 (pp. 1-18). New York: Plenum Press.

Massart, D. L., & Kauffmann, L. (1983). *Interpretation of analytical data by use of cluster analysis*. New York: Wiley.

Noel, S., & Collin, S. (1995). Trans-2-nonenal degradation products during mashing. In *Proceedings of the 25th European brewery convention congress* (pp. 483-490). Oxford: IRL Press.

Citing and listing of web references. As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication,

etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly "Articles in Press" because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*: doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

Illustrations

Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet. Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (e.g. in graphs).

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale'(for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations. As only one figure caption may be used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

6 CONCLUSÃO

Foi possível estabelecer uma nova técnica para extrair e purificar o ácido fítico do farelo de arroz com alta pureza e rendimento. Na extração do ácido fítico de farelo de arroz, a temperatura, a concentração de HCl e o tempo de extração influenciaram significativamente ($p < 0,05$), enquanto a concentração de farelo de arroz não foi significativa.

Utilizando o ensaio da batofenantrolina (BPS) o ácido fítico purificado de farelo de arroz apresentou capacidade queladora do íon ferro, que foi dependente da concentração e do tempo de contato para a formação do complexo Fe^{2+} -ácido fítico antes da adição da BPS. No ensaio da deoxirribose o ácido fítico inibiu o radical hidroxil confirmando mais uma vez a sua capacidade antioxidante.

O ácido fítico purificado de farelo de arroz em carne mecanicamente separada (CMS) de frango reduziu a oxidação lipídica e aroma de requentado (WOF). O ácido fítico purificado de farelo de arroz em mortadela apresentou maior efeito na redução da oxidação lipídica em comparação ao eritorbato de sódio e quando em combinação com o eritorbato de sódio apresentou um efeito sinérgico na inibição oxidativa.

ANEXO

ANEXO**Trabalhos Apresentados em Eventos Científicos****I Simpósio em Ciência e Tecnologia em Alimentos - sbCTA - Bahia, 2009**

Ácido Fítico dos Componentes do Arroz e Otimização da Extração

Autores: Cristiane Canan, Felipe T. L. Cruz, Cleonice P. M. Sarmiento, Elza I. Ida

8 Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - SLACA - Campinas, 2010

Propriedades Antioxidantes do ácido fólico obtido de farelo de arroz: Avaliação da atividade queladora de íons ferro.

Autores: Cristiane Canan, Fernanda Delaroza, Rubia Casagrande, Massami Shimokomaki, Elza I. Ida.

Trabalhos Apresentados em Eventos de Iniciação Científica**XVIIIEAIC - Encontro anual de iniciação científica, Unioeste, Foz do Iguaçu, PR**

Influência da concentração e proporção de ácido clorídrico na extração de ácido fólico do farelo de arroz

Autores: Felipe T. L. Cruz (IC-CNPQ), Cristiane Canan, Cleonice P. Sarmiento, Elza I. Ida.

Avaliação da composição química e teor de ácido fólico de farelos de arroz

Autores: Pedro P. Paccola (PIBIC/UEL), Cristiane Canan, Cristina T. Filgueiras, Elza I. Ida.

XVIIIIEAIC - Encontro anual de iniciação científica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR

Caracterização química do ácido fólico obtido do farelo de arroz

Autores: Mauro Papi, Cristiane Canan, Elza Iouko Ida.