



VANUZIA RODRIGUES FERNANDES FERREIRA

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF EUGENOL
DERIVATIVES: EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY
AND INHIBITION OF LIPID OXIDATION IN MECHANICALLY
SEPARATED POULTRY MEAT AND MORTADELLA**

**LAVRAS - MG
2022**

VANUZIA RODRIGUES FERNANDES FERREIRA

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF EUGENOL DERIVATIVES:
EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY AND INHIBITION OF LIPID
OXIDATION IN MECHANICALLY SEPARATED POULTRY MEAT AND
MORTADELLA**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS DE EUGENOL: AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E INIBIÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM
CARNE DE AVES MECANICAMENTE SEPARADA E MORTADELAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica área de concentração em Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

Profa. Dra. Barbara Sayuri Bellete
Prof. Dr. Eduardo Mendes Ramos
Coorientadores

**LAVRAS - MG
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Ferreira, Vanuzia Rodrigues Fernandes.

Synthesis and characterization of eugenol derivatives: :
Evaluation of antioxidant activity and inhibition of lipid oxidation
in mechanically separated poultry meat and mortadella / Vanuzia
Rodrigues Fernandes Ferreira. - 2022.

190 p. : il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Coorientador(a): Barbara Sayuri Bellete, Eduardo Mendes
Ramos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Semisynthesis. 2. Guaiacol derivatives. 3. Oxidative
stability. I. Cardoso, Maria das Graças. II. Bellete, Barbara Sayuri.
III. Ramos, Eduardo Mendes. IV. Título.

VANUZIA RODRIGUES FERNANDES FERREIRA

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF EUGENOL DERIVATIVES:
EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY AND INHIBITION OF LIPID
OXIDATION IN MECHANICALLY SEPARATED POULTRY MEAT AND
MORTADELLA**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS DE EUGENOL: AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E INIBIÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM
CARNE DE AVES MECANICAMENTE SEPARADA E MORTADELAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica área de concentração em Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 28 de setembro de 2022
Dr. Sergio Scherrer Thomasi, UFLA
Dr. Eduardo Ramos Mendes, UFLA
Dr. David Lee Nelson, UFVJM
Dra. Maria Graça Costa Miguel, UAlg FCT

Prof(a). Dr(a). Maria das Graças Cardoso
Orientadora

Prof(a). Dr(a). Barbara Sayuri Bellete
Prof. Dr. Eduardo Mendes Ramos
Coorientadores

**LAVRAS - MG
2022**

Ao amado, Jesus

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai, por me sustentar em todo o tempo e por me dar uma esperança viva.

À Instituição de Ensino Universidade Federal de Lavras (UFLA), por todo suporte financeiro e laboratorial oferecido e pela experiência acadêmica proporcionada.

Aos órgãos de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig – Projeto CAG/APQ02390/18) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Bolsa de produtividade 309733/2017-0), pelo apoio e suporte financeiro.

Ao meu marido, Marcelo, pelo companheirismo, cuidado e carinho, por orar por mim, enxugar minhas lágrimas e por comemorar comigo cada vitória.

A toda a minha família que, de longe ou de perto, me acompanha e apoia os meus sonhos, por orarem e acreditarem em mim.

Em especial, agradeço à professora Dra. Maria das Graças, pelas muitas oportunidades de aprendizado e experiências acadêmicas, de laboratório e de vida, pelo carinho e pela confiança depositada em mim, pela amizade e por me orientar em todas as áreas da minha vida. Sempre me lembrarei, com muito carinho, dos seus ensinamentos.

Ao Professor Dr. Eduardo Mendes Ramos, por me coorientar com tamanha dedicação e disponibilidade, por me dar a oportunidade de expandir meus conhecimentos em uma nova área, por toda a ajuda e confiança.

À professora Dra. Barbara Sayuri Bellete, pela orientação, pelas análises de RMN e por todas as conversas e discussões agradáveis, pelos conselhos valiosos, pela disponibilidade e carinho.

Ao Professor David Lee Nelson, pelos esclarecimentos e ensinamentos ao longo de todo o trabalho, pela disponibilidade e tradução dos artigos.

Ao Prof. Dr. Mario César Guerreiro, pela disponibilização do equipamento Rancimat, pela confiança, conselhos e ensinamentos valiosos.

À Professora Katia Júlia de Almeida, pela ajuda nas análises computacionais e por toda a disponibilidade e atenção.

Aos Membros da Banca Examinadora, por contribuírem com o trabalho, engrandecendo-o e tornando-o melhor.

À Central de Análise e Prospecção Química do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, pela instalação e infraestrutura necessária para a realização das análises cromatográficas e de infravermelho.

À Central Analítica do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal do Mato Grosso, pelas análises de RMN.

À Dra. Lidiany Zacaroni, pela paciência, dedicação, prontidão e profissionalismo, essenciais para a realização das análises cromatográficas e de estabilidade oxidativa.

À Dra Maria Luisa Teixeira, por todo o apoio emocional, pela amizade e companheirismo.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Agroquímica e aos secretários e funcionários do Departamento de Química e do Departamento de Ciências dos Alimentos, por toda a atenção e pela ajuda prestada.

Aos Colegas do Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais e de Análise de Qualidade de Aguardente, pelo companheirismo, paciência, pelo auxílio antes, durante e após a execução do experimento, pela boa convivência, pela amizade.

Aos Colegas do Laboratório de Tecnologia de Carnes e Derivados (LabCarnes), pela boa convivência, pelas conversas, risadas, paciência e por me auxiliarem em tudo que precisei.

Aos Amigos de Lavras e da Igreja Batista Vale das Bênçãos Independente, por serem a melhor terapia do universo.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste sonho!

Resumo

Objetivou-se no presente trabalho sintetizar os derivados acetato de eugenila e bis-eugenol a partir do eugenol comercial e caracterizá-los; avaliar a influência das modificações estruturais na atividade antioxidante, estabilidade oxidativa e citotoxicidade; avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de eugenol e seus derivados na qualidade oxidativa de carne mecanicamente separada (CMS) de frango estocada por 8 dias a 0 °C; avaliar a influência sensorial e a estabilidade oxidativa de mortadelas curadas e não curadas processadas com CMS contendo eugenol e seus derivados, durante o armazenamento fatiado por 60 dias a 4°C. O eugenol foi acetilado com rendimento de 81% e oxidado para formação de 57% de bis-eugenol. Os produtos obtidos foram caracterizados por FTIR e ¹HMN e avaliados quanto à atividade antioxidante e citotoxicidade. A CMS de frango foi obtida e imediatamente tratada com 250, 500, 1000 e 2000 ppm de eugenol e seus derivados. A qualidade oxidativa da CMS (tratamentos e controle) foi avaliada nos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 de armazenamento a 0 °C. A CMS de frango contendo 250 ppm de eugenol e seus derivados foi utilizada no processamento de mortadelas curadas e não curadas para avaliação das características tecnológicas, sensoriais e estabilidade oxidativa dos produtos fatiados e armazenados por 60 dias a 4 °C. A CMS de frango contendo 250 ppm de eugenol e seus derivados foram utilizadas no processamento de mortadelas curadas e não curadas, sem prejuízo nas características tecnológicas do produto. Na obtenção dos derivados, o bis-eugenol apresentou maior estabilidade oxidativa pelo método Rancimat. O eugenol e o bis-eugenol apresentaram atividade antioxidante semelhante ao antioxidante BHT nos ensaios de DPPH, TBARS e fosfomolibdênio. Os derivados apresentaram menor citotoxicidade em células de fibroblastos palpebrar do que o eugenol, e a acetilação diminuiu o efeito antioxidante in vitro do acetato de eugenila. Todos os compostos controlaram a oxidação lipídica (TBARS e hexanal) e proteica nas concentrações avaliadas, com um ligeiro aumento no índice de TBARS, no 8° dia. Nenhuma alteração foi verificada nos níveis de hexanal durante o armazenamento. A CMS controle exibiu maior oxidação proteica e maior conteúdo de compostos voláteis característicos de processos oxidativos durante o armazenamento. A adição dos antioxidantes não alterou a cor (*h**), mas contribuiu para uma CMS mais clara (*L**) em relação ao controle. As mortadelas curadas com CMS contendo acetato de eugenila e bis-eugenol apresentaram menor formação de malondialdeído (MDA) do que o controle. Em mortadelas não curadas, o eugenol e seus derivados apresentaram o mesmo efeito, controlando a formação de MDA, quando comparados ao controle. Os tratamentos não influenciaram na formação e degradação da cor curada e pigmentada por carmim de cochonilha. A maior aceitação sensorial foi observada nos tratamentos curados. O eugenol e seus derivados melhoraram os atributos sensoriais dos produtos e somente os tratamentos contendo bis-eugenol não apresentaram sabor de cravo-da-índia. Todos os compostos atuaram igualmente como antioxidante em produtos não curados, concluindo que o bis-eugenol é uma opção de antioxidante em matrizes alimentares.

Palavras-chave: Semissíntese. Propriedades biológicas. Derivados Guaiacol. Estabilidade oxidativa. Derivados Cárneos.

Abstract

The objectives of the present work were to synthesize eugenyl acetate and bis-eugenol from commercial eugenol and characterize the products; to evaluate the influence of structural modifications on antioxidant activity, oxidative stability and cytotoxicity; to evaluate the effect of the addition of different concentrations of eugenol and its derivatives on the oxidative stability of mechanically separated chicken meat (MSM) stored for 8 days at 0 °C; to evaluate the sensory influence and oxidative stability of cured and uncured bologna processed with sliced MSM containing eugenol and its derivatives during storage for 60 days at 4 °C. Eugenol was acetylated in 81 % yield and oxidized to 57 % bis-eugenol. The products obtained were characterized by FTIR and ¹HMN and evaluated for antioxidant activity and cytotoxicity. Chicken MSM was obtained and immediately treated with 250, 500, 1000 and 2000 ppm of eugenol and its derivatives. The oxidative quality of MSM (treatments and control) was evaluated after 0, 2, 4, 6 and 8 hours at 0 °C. Chicken MSM containing 250 ppm eugenol and its derivatives was used in the processing of cured and uncured bologna to evaluate the technological, sensory and oxidative stability characteristics of sliced products stored for 60 days at 4 °C. No negative effect on the technological characteristics of the product was observed. Greater oxidative stability was observed for the bis-eugenol by the Rancimat method. Antioxidant activities similar to that of the antioxidant BHT were observed for eugenol and bis-eugenol in the DPPH, TBARS and phosphomolybdenum assays. Lower cytotoxicity on eyelid fibroblast cells was observed for the derivatives than for eugenol, and acetylation decreased the in vitro antioxidant effect of eugenyl acetate. All the compounds controlled lipid (TBARS and hexanal) and protein oxidation at the concentrations evaluated, with a slight increase in the TBARS index on the 8th day. No change was observed in hexanal levels during storage. Greater protein oxidation and larger contents of volatile compounds characteristic of oxidative processes during storage were observed for the control MSM. The addition of antioxidants did not change the color (h*), but contributed to an MSM of a lighter tone (L*) than that of the control. Less malondialdehyde (MDA) formation was observed for the bologna cured with MSM containing eugenyl acetate and bis-eugenol than for the control. The same effect was observed for the control of the formation of MDA in uncured bologna containing eugenol and its derivatives as with the control sample. The treatments did not influence the formation and degradation of color in meat that was cured and pigmented by cochineal carmine. The greatest sensory acceptance was observed in cured treatments. Eugenol and its derivatives improved the sensory attributes of the products and only the treatments containing bis-eugenol did not present a clove flavor. All the compounds acted equally as an antioxidant in uncured products, concluding that eugenyl concluding that bis-eugenol is an antioxidant option in food matrices.

Keywords: Semisynthesis. Biological properties. Guaiacol derivatives. Oxidative stability. Meat Derivatives.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figure 1- Metabolismo secundário da glicose: via de formação dos principais metabólitos secundários.	18
Figure 2- Biossíntese do aminoácido fenilalanina.	22
Figure 3- Biossíntese dos álcoois monolignóis.	23
Figure 4- Biossíntese de Fenilpropanoides.	24
Figure 5- Cravo-da-índia (<i>Eugenia caryophyllata</i> ou <i>Syzygium aromaticum</i>).	25
Figure 6- Estrutura básica de derivados de Guaiacol.	27
Figure 7- Sítios de doação de hidrogênio na molécula de eugenol.	28
Figure 8- Derivados guaiacol com aroma de cravo.	29
Figure 9- Modificações simples na molécula de eugenol.	30
Figure 10- Provável mecanismo de acetilação do eugenol.	31
Figure 11- Provável mecanismo de oxidação radicalar do eugenol.	33
Figure 12- Etapas do processo radicalar de oxidação lipídica e ação de antioxidantes.	36
Figure 13- Estrutura química dos antioxidantes sintéticos.	37
Figure 14- Relação estrutura-atividade do eugenol.	38
Figure 15- Cromóforos formados na estabilização de radicais DPPH (A) e na condensação de malonaldeído com TBA (B).	40
Figure 16- Esquema geral da produção de Carnes Mecanicamente Separadas.	44

SEGUNDA PARTE

ARTIGO I

Figure 1. Gas chromatogram from the CG-MS: A - <i>S. aromaticum</i> essential oil. Identification of peaks: ¹ Eugenol, and ² (E) β -ocimeno. B - <i>O. vulgare</i> essential oil. Identification of peaks: ¹ Sabinene, ² β -Pinene, ³ α -Terpinene, ⁴ <i>p</i> -Cimene, ⁵ Limonene, ⁶ (E) β -Ocimene, ⁷ γ -Terpinene, ⁸ <i>Cis</i> -Sabinene hydrate, ⁹ Terpinolene, ¹⁰ <i>trans</i> -Sabinene hydrate, ¹¹ Linalyl formate, ¹² Terpinen-4-ol, ¹³ α -Terpineol, ¹⁴ Linalyl acetate, ¹⁵ Carvacrol, ¹⁶ γ -Cadinene, ¹⁷ Bicyclgermacrene.	78
Figure 2. Cyclic voltammograms obtained on the surface of the glassy carbon electrode, the scanning speed 50 mV s ⁻¹ in 0.05 mol L ⁻¹ of sodium sulfate (NaSO ₄). (A) Electrochemical behavior of isolated iron(II) ion ([Fe(SO ₄)] ₂ .5H ₂ O) in increasing concentration (7-278 μ g mL ⁻¹). (B) Electrochemical behavior of iron(II) ion ([Fe(SO ₄)] ₂ .5H ₂ O) at 139 μ g mL ⁻¹ in presence of increasing concentration of EDTA (50-500 μ g mL ⁻¹).	82
Figure 3- Cyclic voltammograms obtained on the surface of the glassy carbon electrode, the scanning speed 50 mV s ⁻¹ in 0.05 mol L ⁻¹ of sodium sulfate (NaSO ₄). Electrochemical behavior of iron(II) ion ([Fe(SO ₄)] ₂ .5H ₂ O) at 139 μ g mL ⁻¹ in presence of increasing concentration of <i>S. aromaticum</i> (A) and <i>O. vulgare</i> (C) essential oil, as well as their majorities: eugenol (B) and carvacrol (D) (50- 500 μ g mL ⁻¹).	84
Figure 4. UV-spectra of interaction between Fe(II) ions and eugenol (A) and carvacrol (B) in increasing concentration Fe:Ligant (1:1 to 1:6).	86
Figure 5. The B3LYP/CBSB7 optimized structures of iron compounds.	88
Figure 6. Cell viability determined from MTS assay. CCD-1059Sk cells were treated for 48 h.	89

ARTIGO II

- Figure 1. Spectrum in the infrared region (4000 to 500 cm^{-1}). Superposition of eugenol and eugenyl acetate (A) and bis-eugenol (B) bands. Chemical structure of eugenyl acetate (C) and bis-eugenol (D) with chemical shifts obtained by ^1H NMR. 119
- Figure 2. Induction time (Rancimat method) of eugenol, eugenyl acetate and bis-eugenol (A-0.05, B-0.1, C-1 and D-2.5 %) and control in sunflower oil determination of conductivity versus time at 110 $^{\circ}\text{C}$ 121
- Figure 3. Antioxidant and dose-dependent effect of BHT, eugenol and its derivatives in assays of (A) stabilization of DPPH radicals, (B) thiobarbituric acid reactive substances-TBARS, (C) liposomes and (D) phosphomolybdenum complexation. 123
- Figure 4. Cell viability was determined by SRB assay. CCD-1059Sk cells treated for 72 hours with eugenyl acetate and bis-eugenol at different concentrations. 127

ARTIGO III

- Figura 1- Média dos efeitos da adição de eugenol (E), acetato de eugenila (A) e bis-eugenol (B): (I) - Índice de peróxidos (IP) de carne mecanicamente separada (CMS) de frango, armazenadas a 0 $^{\circ}\text{C}$, média das diferentes concentrações (250 a 2000 mg/Kg) de antioxidante e do tempo de armazenamento. (II) - Variação do índice de peróxidos (IP) de carne mecanicamente separada (CMS) de frango, média do controle e tratamentos, durante o período de armazenamento. CHP = hidroperóxido de cumeno. Barras representam o erro padrão da média.. 150
- Figura 2- Média dos efeitos da adição de diferentes concentrações (250 a 2000 mg/Kg) de antioxidantes (eugenol, acetato de eugenila e bis-eugenol) e controle: (I) - índice de TBARS e (II) conteúdo de hexanal em carne mecanicamente separada (CMS) de frango armazenada a 0 $^{\circ}\text{C}$. MAD = malonodialdeído. Barras representam o erro padrão da média. Linhas representam a média dos tratamentos e controle. 151
- Figura 3- Média do efeito da adição de diferentes concentrações de antioxidantes (eugenol, acetato de eugenila e bis-eugenol) nas concentrações de 250 a 2000 mg/Kg e controle (0 mg/Kg) sobre a oxidação proteica em CMS de frango durante todo o armazenamento a 0 $^{\circ}\text{C}$. (II) - Variação da oxidação proteica durante o período de armazenamento em carne mecanicamente separada (CMS) de frango, média do controle e tratamentos. Barras representam o erro padrão da média. Linhas representam a média dos tratamentos e controle. 152
- Figura 4- Análise de componentes principais (PCA) bi-plot de compostos orgânicos voláteis (VOC) formados em carne mecanicamente separada (CMS) de frango armazenada a 0 $^{\circ}\text{C}$ por oito dias. Tratamentos: sem adição de antioxidantes (Controle); e com adição de eugenol (E), acetato de eugenila (A) e bis-eugenol (B) em diferentes concentrações (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg)..... 154
- Figura 5- Análise de componentes principais (PCA) bi-plot de compostos orgânicos voláteis (VOC) formados em carne mecanicamente separada (CMS) de frango não-tratadas (C, controle) e tratadas com antioxidantes (E, eugenol; A acetato de eugenila; e B, bis-eugenol) em diferentes tempos de armazenamento (d, dias: 0, 2, 4, 6 e 8) a 0 $^{\circ}\text{C}$ 155
- Figura 6- Média dos efeitos da concentração de antioxidantes (E, eugenol; A, acetato de eugenila; e B, bis-eugenol) e controle (0 mg/Kg) sobre os índices de cor: (I) luminosidade (L^*) e (II) saturação (C^*) de carne mecanicamente separada (CMS) armazenada por oito dias a 0 $^{\circ}\text{C}$. Barras representam o erro padrão da média. 157

Figura 7- Média do efeito de armazenamento (a 0 °C) sobre os índices de cor luminosidade (L*), saturação (C*) e ângulo de tonalidade (h) da carne mecanicamente separada (CMS) de frango tratamentos e controle.....157

ARTIGO IV

Figura 1- Efeito dos tratamentos da carne mecanicamente separada (CMS) no teor de gordura do exsudado (GFE) da massa emulsionada de mortadelas durante o cozimento. Tratamentos: CMS controle (C); e tratada com acetato de eugenila (A), bis-eugenol (B) ou eugenol (E). Médias seguidas de letras distintas (a-c) diferem (P < 0,05) pelo teste de Tukey. Barras representam o erro padrão da média.....174

Figura 2- Média do efeito dos tratamentos da carne mecanicamente separada (CMS) no índice de TBARS de mortadelas curadas e não curadas. Tratamentos: CMS controle (C); e tratada com acetato de eugenila (A), bis-eugenol (B) ou eugenol (E). Médias seguidas de letras distintas (a,b) diferem (P < 0,05) pelo teste de Tukey. Barras representam o erro padrão da média.....176

Figura 3- Fotografia das mortadelas curadas e não curadas elaboradas com carne mecanicamente separada (CMS) não tratadas (controle; C) e tratadas com acetato de eugenila (A), bis-eugenol (B) e eugenol (E).....177

Figura 4- Média do efeito dos tratamentos da carne mecanicamente separada (CMS) no ângulo de tonalidade (h) da cor de mortadelas curadas e não curadas. Tratamentos: CMS controle (C); e tratada com acetato de eugenila (A), bis-eugenol (B) ou eugenol (E). Médias seguidas de letras distintas (a,b) diferem (P < 0,05) pelo teste de Tukey. Barras representam o erro padrão da média.....177

Figura 5- Análise de Correspondência (CA) bi-plot descritores sensoriais apontados por avaliadores para as mortadelas elaboradas curadas (C, E, A e B) e não curadas (C*, E*, A* e B*) processadas com 60% de CMS controle (C) e CMS contendo 250 ppm de eugenol (E), acetato de eugenila (A) e bis-eugenol (B).....179

Figura 6- Efeito dos tratamentos da carne mecanicamente separada (CMS) nas notas atribuídas pelos provadores para mortadelas curadas e não curadas para os atributos sensoriais avaliados.....180

Figura 7- Efeitos dos (A) tratamentos da carne mecanicamente separada (CMS) nos valores de TBARS e do (B) tempo de armazenamento (dias) nos índices de cor e perda da cor curada (fading) de mortadelas curadas (adicionadas de nitrito). Tratamentos: mortadela controle (M-C); e com CMS tratada com acetato de eugenila (M-A), bis-eugenol (M-B) ou eugenol (M-E). Luminosidade (L*); Saturação (C*) e Tonalidade (h). Médias, em cada característica, seguidas de letras distintas (a-c) diferem (P < 0,05) pelo teste de Tukey. Barras representam o erro padrão da média.....181

Figura 8-Efeitos dos (A) tratamentos da carne mecanicamente separada (CMS) e do (B) tempo de armazenamento (dias) nos valores de TBARS de mortadelas não curadas. Tratamentos: mortadela controle (UM-C); e com CMS tratada com acetato de eugenila (UM-A), bis-eugenol (UM-B) ou eugenol (UM-E). Médias, em cada característica, seguidas de letras distintas (a-c) diferem (P < 0,05) pelo teste de Tukey. Barras representam o erro padrão da média.....183

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Table 1- Percent of chemical constituents found in the essential oils from *S. aromaticum* and *O. vulgare*.....79

Table 2- The B3LYP/CBSB7 bonding energies ΔE_{Bond} in the gas-phase/water solution in kcal mol⁻¹.....88

ARTIGO II

Table 1- Induction time (h) of autooxidation for sunflower oil after addition eugenol, eugenyl acetate and bis-eugenol at increasing concentrations.....122

Table 2- IC₅₀ values from the DPPH, TBARS, liposomes and slope assays for the phosphomolybdenum complexing assay obtained for BHT, eugenol, eugenyl acetate and bis-eugenol.....124

ARTIGO IV

Tabela 1- Composição centesimal e características tecnológicas (média \pm desvio padrão) de mortadelas curadas (M) e não curadas (UM) formuladas com 60% de CMS de frango.....173

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	15
1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Óleos Essenciais.....	17
2.2 Biossíntese de Fenilpropanoides	20
2.3 Propriedades Biológicas do Eugenol	25
2.4 Características Estruturais e Modificações na Molécula de Eugenol.....	27
2.5 Técnicas Espectroscópicas para Determinação de Compostos Orgânicos....	33
2.6 Atividade Antioxidante.....	34
2.7 Antioxidantes em Produtos Alimentícios.....	41
2.8 Carnes	42
2.8.1 Carne Mecanicamente Separada.....	43
2.8.2 Mortadela	46
2.9 Análise de Alimentos	49
2.9.1 Análise centesimal.....	49
2.9.2 Análise de Oxidação lipídica, Voláteis e Oxidação de Proteínas	50
2.9.3 Análise de Cor	54
2.9.4 Análise sensorial.....	55
REFERÊNCIAS	56
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	69
ARTIGO I – ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AND THEIR PRINCIPAL COMPONENTS: SPECTROPHOTOMETRIC, VOLTAMMETRIC AND THEORETICAL INVESTIGATION OF THE CHELATING EFFECT OF EUGENOL AND CARVACROL	69
ARTIGO II – SYNTHESIS OF EUGENOL DERIVATIVES: EVALUATION OF THE STRUCTURAL INFLUENCE ON OXIDATIVE STABILITY, ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC PROPERTIES	108
ARTIGO III – USO DE DERIVADOS DE EUGENOL NO CONTROLE DA OXIDAÇÃO LIPÍDIA EM CARNE DE AVES SEPARADA MECÂNICAMENTE	140
ARTIGO IV- UTILIZAÇÃO DE CARNE DE AVES SEPARADA MECÂNICAMENTE PRÉ-MISTURADA COM DERIVADOS DE EUGENOL NA ELABORAÇÃO DE MORTADELA CURADA E NÃO CURADA	163
CONCLUSÕES GERAIS	189
CONSIDERAÇÕES FINAIS	190

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O eugenol é um fenilpropanoide encontrado naturalmente no óleo essencial de cravo-da-índia. E historicamente empregado em processos de conservação, apresentando grande potencial antioxidante. Seu potencial, associado às mudanças nos hábitos alimentares da sociedade atual, abre novos caminhos e perspectivas para aplicação do eugenol na indústria de alimentos em substituição ou associação aos antioxidantes utilizados no mercado. Entretanto, a aplicabilidade do eugenol é dificultada e limitada devido a seu intenso odor e sabor, que inviabilizam sua utilização pelas indústrias como uma alternativa real e rentável em larga escala e para uma ampla faixa de produtos. A abundância e reatividade do eugenol torna essa molécula valiosa em empreendimentos sintéticos, possibilitando a síntese de derivados oriundos de produtos naturais de menor abundância, que podem apresentar atividade antioxidante tão alta quanto o eugenol e contribuir com diferentes características sensoriais, conferindo uma aplicabilidade real desses compostos na indústria de alimentos com aceitação sensorial por parte dos consumidores.

Entre os derivados do eugenol, destacam-se o acetato de eugenila e o bis-eugenol. A ausência da hidroxila fenólica no acetato de eugenila contribui para diferentes atividades biológicas e ressalta a importância de outros sítios ativos em fenilpropanoides. Além disso, o acetato de eugenila é considerado seguro para utilização em alimentos (GRAS). O bis-eugenol é um dímero de eugenol que apresenta maior potencial antioxidante e menor toxicidade que seu monômero e apresenta diversas propriedades biológicas. O eugenol e seus derivados apresentam inúmeras atividades biológicas e sua aplicação na indústria de alimentos pode ser um caminho para atender às demandas de mercado por aditivos e antioxidantes bioativos e percebidos pelos consumidores como mais saudáveis.

Carnes e produtos cárneos emulsionados são matrizes alimentícias altamente susceptíveis a processos oxidativos, devido ao seu alto teor de gordura e de proteínas. Entre essas matrizes, a carne mecanicamente separada (CMS) é um subproduto da indústria de carnes utilizada na formulação de produtos cárneos, especialmente emulsionados como salsichas e mortadelas, por constituir uma fonte de proteínas de alto valor biológico e economicamente mais acessível. Entretanto, o processo de obtenção da CMS contribui para uma matriz altamente oxidável, pois expõe lipídios e proteínas a calor, oxigênio e íons metálicos, como ferro e cálcio; condições que catalisam processos oxidativos e levam à rápida degradação e perda das características nutricionais e sensoriais da CMS e, conseqüentemente, dos produtos cárneos em que é adicionada. Diversas tecnologias vêm sendo estudadas e

desenvolvidas para proporcionar maior estabilidade oxidativa em CMS e nos produtos em que é adicionada, destacando-se entre elas a adição de antioxidantes derivados de produtos naturais. A CMS apresenta-se como uma excelente matriz para a verificação da atividade antioxidante do eugenol e de seus derivados, por ser altamente oxidável e pela possibilidade de sua utilização na formulação de produtos cárneos, que podem ser avaliados sensorialmente, a fim de verificar as interferências sensoriais do eugenol e seus derivados em alimentos. Além disso, a utilização de CMS possibilita avaliar o potencial desses compostos em produtos cárneos, com e sem adição de nitrito. Objetivou-se no presente trabalho sintetizar e caracterizar os derivados acetato de eugenila e bis-eugenol, a partir do eugenol comercial; avaliar a influência das modificações estruturais na atividade antioxidante, estabilidade oxidativa e citotoxicidade; avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de eugenol e seus derivados na qualidade oxidativa de CMS de frango estocada por 8 dias a 0 °C; avaliar a influência sensorial e a estabilidade oxidativa de mortadelas curadas e não curadas processadas com CMS contendo eugenol e seus derivados durante o armazenamento fatiado, por 60 dias a 4°C.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Óleos Essenciais

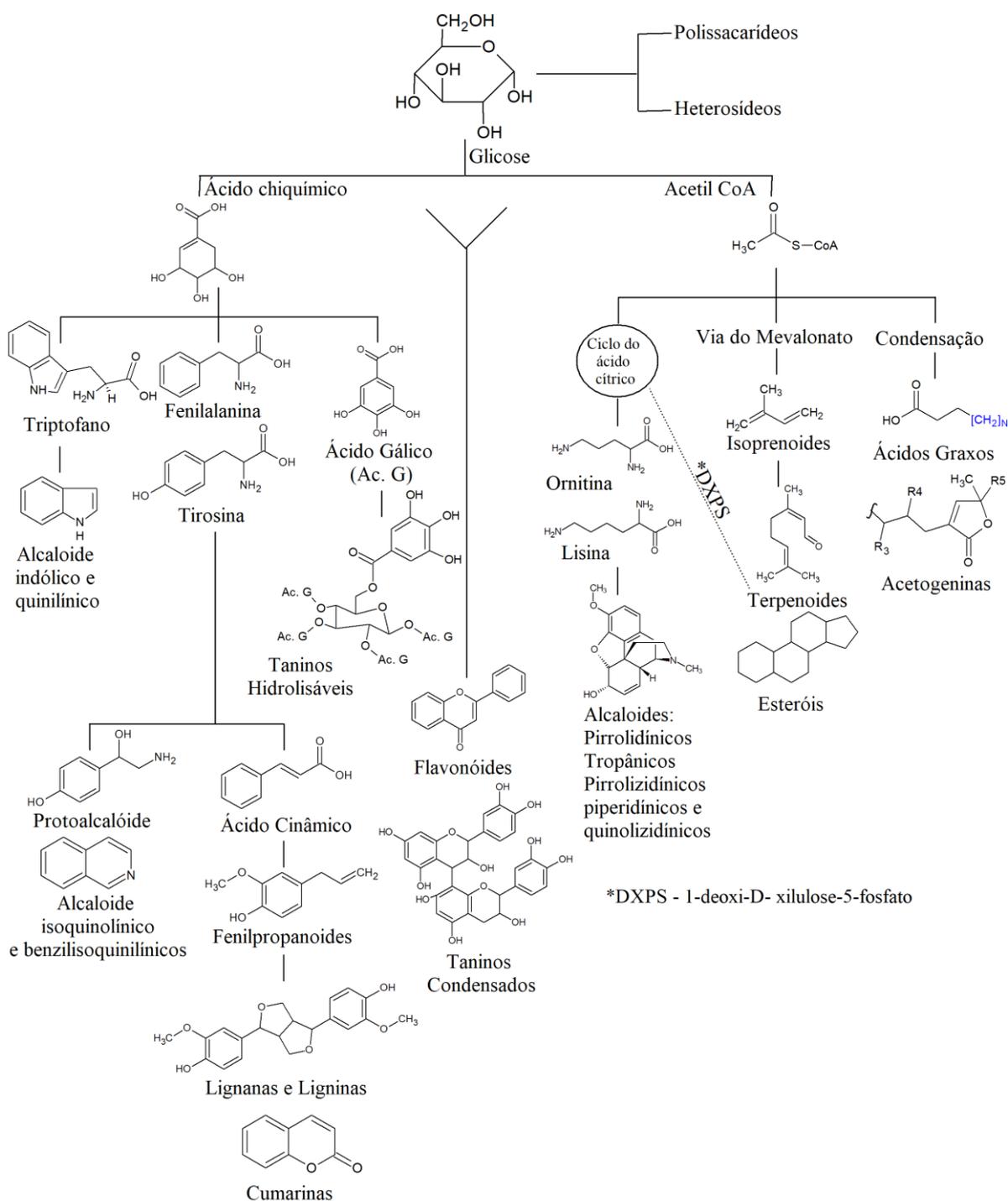
Desde os primórdios da civilização, o reino vegetal tem fornecido à humanidade meios para seu desenvolvimento e perpetuação, seja pela alimentação ou pela prevenção e cura de suas enfermidades. A importância dos produtos naturais na descoberta e síntese de novos materiais é historicamente observada pelo desenvolvimento de medicamentos, como a aspirina; de inseticidas, como os piretroides; de corantes e outras diferentes classes de compostos que são atualmente utilizadas pela sociedade e foram isoladas, sintetizadas ou tiveram substâncias produzidas por plantas como protótipos (ALAMGIR, 2017, CHEN et al., 2015, SPARKS, 2013).

A bioatividade encontrada nas espécies vegetais é um atributo do metabolismo secundário das plantas, que corresponde a uma resposta adaptativa delas ao meio ambiente em que estão inseridas. O metabolismo secundário da glicose via ácido chiquímico e acetilCoA (FIGURA 1) não têm contribuição significativa na manutenção dos processos fundamentais à vida das plantas, mas desempenham importante papel na sua proteção contra insetos, pragas, herbívoros, fitopatógenos, microorganismos, raios UV, perda de água, entre outros fatores presentes em seu habitat (TAKSHAK; AGRAWAL, 2019; THAKUR et al., 2019; SIMÕES et al., 2007).

As classes de metabólitos secundários mais conhecidos são alcaloides, antocianinas, flavonoides, lignanas, ligninas, esteroides, terpenoides e fenilpropanoides, os quais vêm sendo estudadas e utilizadas como produtos farmacêuticos, cosméticos, agroquímicos, biopesticidas, aromatizantes, intensificadores de cores, aditivos alimentares, entre outros (ALAMGIR, 2017; TAKSHAK; AGRAWAL, 2019; THAKUR et al., 2019).

E os produtos de origem natural, destacam-se os óleos essenciais, que são definidos como uma mistura complexa de terpenos e fenilpropanoides, extraídos de plantas por processos de hidrodestilação ou arraste a vapor d'água, bem como expressão de pericarpos de frutos cítricos (ISO 9235: 2013). Os componentes de óleos essenciais podem ser extraídos de todos os órgãos da planta, desde flores, folhas, caules, sementes, frutos, raízes, até rizomas; e armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Uma vez extraídos, os óleos essenciais possuem odores geralmente agradáveis, sabor acre (ácido) e picante, são incolores ou amarelados, com exceção do óleo de camomila, que possui coloração azul, pela presença de azulenos. São lipofílicos e menos densos do que a água, com exceção de óleos ricos em eugenol e seus derivados (BASER; BUCHBAUER, 2015; SIMÕES et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2012).

Figura 1- Metabolismo secundário da glicose: via de formação dos principais metabólitos secundários.



Fonte: Do autor (2022), adaptado de Simões et al. (2007)

Os óleos essenciais têm, ao longo dos anos, ganhado destaque por seus resultados promissores em bioensaios de avaliação antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antitumoral, entre outros (CAMARGO et al., 2020; FERREIRA et al., 2019; PAVITHRA; MEHTA; VERMA, 2019; WANG et al., 2018). Por serem classificados como GRAS (Geralmente

Reconhecidos como Seguros), o seu uso em produtos alimentícios como aditivos tem sido largamente explorado e são considerados uma alternativa na busca por conservantes e antioxidantes de origem natural devido à presença de muitos compostos aromáticos e fenólicos em sua constituição e por conferirem diversos benefícios à saúde do consumidor (PATEIRO et al., 2018).

Vários estudos apontam para o potencial dos óleos essenciais e seus componentes químicos para a indústria de alimentos. de Oliveira et al. (2012) avaliaram a influência do óleo essencial de *Satureja montana* L. em diferentes concentrações sobre a oxidação de pigmentos e de lipídeos em mortadelas formuladas com diferentes concentrações de nitrito de sódio (NaNO_2). Os autores verificaram redução na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em mortadelas formuladas com as menores concentrações de óleo essencial e sem adição de nitrito. Sobrinho et al. (2016) avaliaram o efeito antioxidante, antifúngico e hemolítico do óleo essencial de *Baccharis trinervis*, encontrando uma moderada ação antioxidante no ensaio de eliminação de DPPH, com IC_{50} de $49,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Também encontraram um IC_{50} de $28,87 \text{ mg mL}^{-1}$ no teste de branqueamento de β -caroteno, além de promissora atividade antifúngica e baixa citotoxicidade em ensaios de hemólise. Saricaoglu e Turhan (2019) investigaram o efeito dos óleos essenciais de cravo-da-índia e tomilho incorporados em revestimentos à base de proteína extraída de carne de frango desossada mecanicamente na qualidade de armazenamento de salaminhos tratados termicamente. Os autores observaram que a aplicação do revestimento à base de óleo essencial de cravo-da-índia diminuiu a perda de peso, retardou a deterioração da cor, inibiu a oxidação lipídica, atrasou o crescimento de microorganismos e melhorou a qualidade dos salaminhos armazenados.

Os óleos essenciais também estão sendo incorporados na dieta de animais. Monteschio et al. (2017) avaliaram o efeito do óleo essencial de cravo-da-índia e alecrim e da mistura de princípios ativos (eugenol, timol e vanilina) na dieta de quarenta novilhas Nelore por 73 dias. Os autores concluíram que o óleo essencial, os princípios ativos e sua mistura usados na alimentação animal mantiveram e melhoraram a qualidade da carne durante o prazo de validade. Ranucci et al. (2019) avaliaram os efeitos sobre a cor e a oxidação da carne de carneiros alimentados com óleos essenciais de endro (*Aneto graveolens* L.), casca de canela (*Cinnamomum Zeylanicum* Blume) e eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.). Observaram que a suplementação alimentar com a mistura de óleos essenciais foi útil para evitar a oxidação da carne, reduzindo a mudança de cor no final do período de armazenamento.

O alto potencial biológico dos óleos essenciais é associado, na maior parte do tempo, ao sinergismo entre todas as moléculas da mistura, mas, em alguns casos, pode ser atribuído à ação de um ou mais componentes majoritários presentes no óleo essencial (FERREIRA et al., 2019; NOVATO et al., 2019). Entretanto, os relatos sobre a aplicação desses compostos na indústria de alimentos sugerem que o aroma intenso, a insolubilidade em água e a alta volatilidade limita a utilização dos óleos essenciais como aditivos de alimentos, gerando off-flavor durante o armazenamento e causando rejeição pelo consumidor (CHAUDHARI et al., 2022; da SILVA et al., 2022).

Além disso, a produção desses compostos pelas plantas é muito baixa (menos de 1% de peso seco) e depende principalmente do estágio fisiológico e de desenvolvimento da planta (THAKUR et al., 2019). Os componentes presentes no óleo essencial sofrem ainda variações significativas em função de fatores edafoclimáticos como região de cultivo, sazonalidade, índice pluviométrico, dentre outros fatores (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; MACCIONI et al., 2021). Por esse motivo, princípios ativos encontrados em óleos essenciais de interesse industrial vêm sendo sintetizados e modificados para utilização controlada e em larga escala.

2.2 Biossíntese de Fenilpropanoides

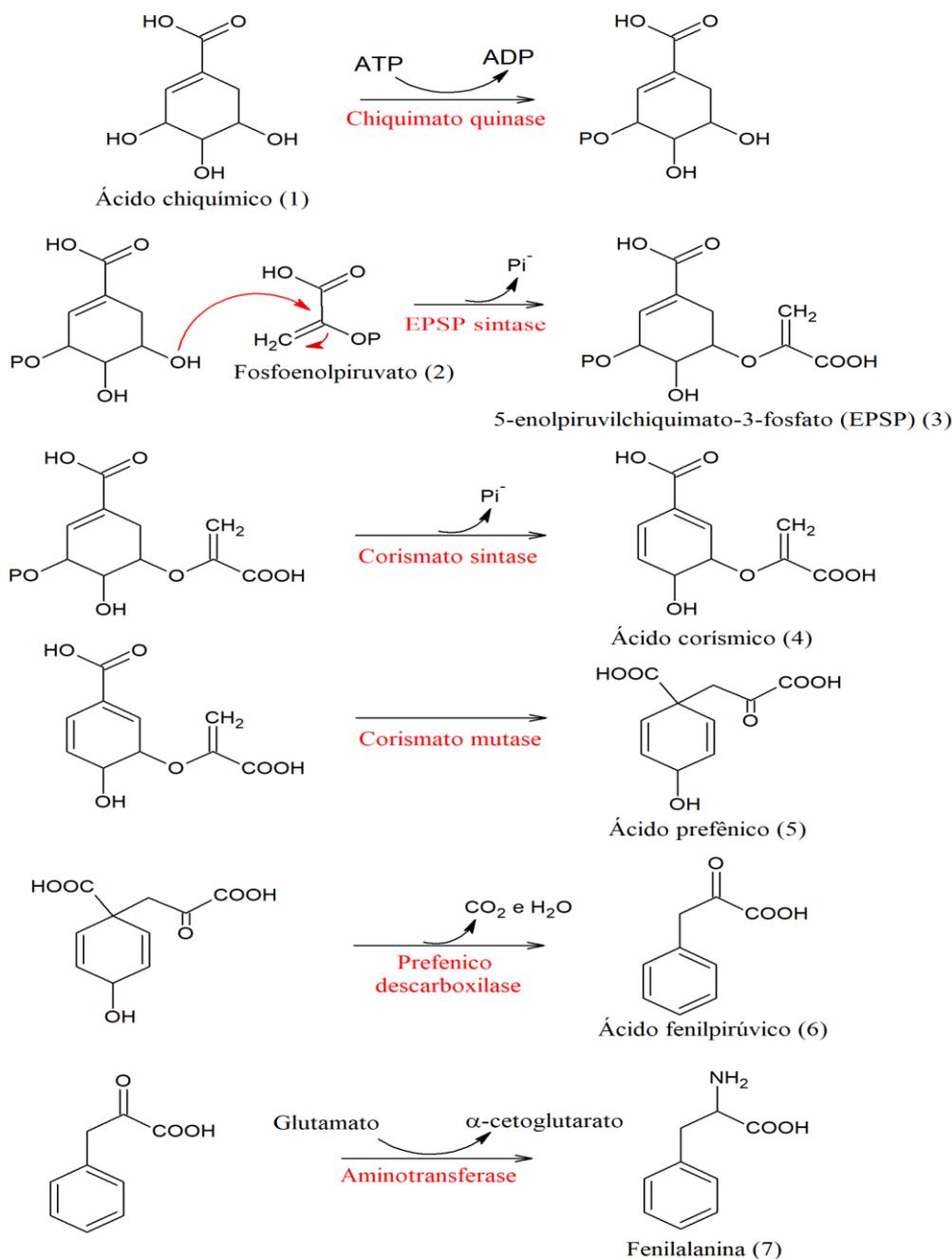
Os fenilpropanoides são encontrados no reino vegetal predominantemente em angiospermas na forma de alilfenóis (chavicol e eugenol) e propenilfenóis (isochavicol e isoeugenol). Alguns fenilpropanoides, incluindo metileugenol e metilchavicol, também podem ser encontrados em gimnospermas (KOEDUKA et al., 2006). Essa classe de compostos possui alta volatilidade e toxicidade para insetos e microrganismos, atuando principalmente na defesa da planta contra condições de estresse, herbívoros, bactérias, fungos, parasitas e raios solares (AMPOFO e NGADI, 2021; de ELGUEA-CULEBRAS; BRAVO; SÁNCHEZ-VIOQUE, 2022; ZOU et al., 2021). Entretanto, são também responsáveis pela polinização de flores (MUHLEMANN et al., 2014; ZOU et al., 2021) e pelo sabor e aroma de diversas frutas cítricas (ATKINSON, 2016; YAUK et al., 2017). Suas propriedades antimicrobianas, bem como aroma e sabor característicos, tornaram essa classe de compostos bastante conhecida e utilizada como especiarias e na conservação de alimentos desde os primórdios da civilização. Além disso, esses compostos têm atraído considerável interesse científico, principalmente para espécies vegetais importantes, como cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), anis-estrelado (*Illicium verum*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), erva-doce (*Foeniculum vulgare*) e outras ervas aromáticas (ATKINSON, 2016; RUTKOWSKA et al., 2020).

De acordo com Zou et al. (2021), os fenilpropanoides, derivados da via do ácido chiquímico, são formados a partir de aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, por meio de uma série de reações, como desaminação e hidroxilação. E o amplo perfil dos fenilpropanoides depende da família de enzimas funcionais, como oxigenases, ligases, oxidorredutases, e várias superfamílias de transferases presentes nas espécies nas quais são produzidos. Os autores ressaltam ainda que os fenilpropanoides participam de muitas vias biossintéticas, entre as quais as mais estudadas são a biossíntese de flavonoides, ligninas e cumarinas.

Entre os fenilpropanoides encontrados nas principais espécies vegetais aromáticas, destacam-se o eugenol, metileugenol, (E) anetol e estragol. O eugenol é o principal constituinte (70-90%) do óleo essencial de cravo-da-índia, conferindo um aroma pungente e distinto à planta; o (E)-anetol está presente em altas proporções (50-80%) no anis-estrelado e possui um forte sabor e aroma de alcaçuz. O estragol e metileugenol são encontrados juntamente com eugenol no manjeriço-doce. Uma combinação entre estragol e (E) anetol é verificada no funcho, conferindo a ele um sabor doce e suave semelhante a anis-estrelado. Alguns óleos de louro (*Pimenta racemosa*) contêm altos níveis de chavicol e eugenol e têm notas de canela, cravo-da-índia e noz-moscada. Os fenilpropanoides também são componentes essenciais do sabor de alimentos processados, incluindo alcaçuz, chás, salsichas e bebidas com sabor de cola (ATKINSON, 2016).

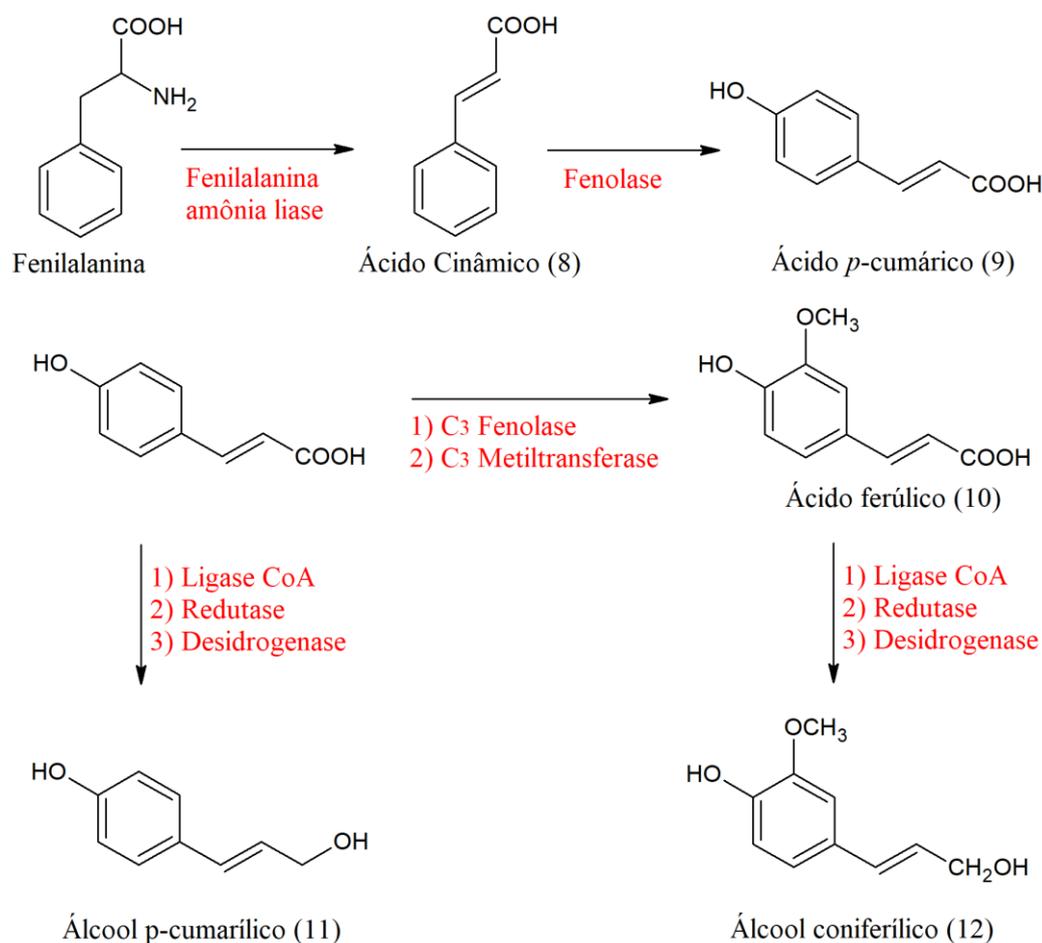
O aminoácido fenilalanina é precursor básico na formação de eugenol e seus derivados, sendo biossintetizado pela via geral dos fenilpropanoides, com ácido chiquímico e fosfoenolpiruvato como precursores básicos da biossíntese (FIGURA 2). A enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) cataliza a reação entre o ácido chiquímico (1) e fosfoenolpiruvato (2) para produzir ácido corísmico (4), passando pelo intermediário, 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (3). Por ação de uma mutase, o ácido corísmico vai a ácido prefênico (5), que, após descarboxilação, gera ácido fenilpirúvico (6). Por fim, o precursor básico dos fenilpropanoides, a fenilalanina (7), é formado por ação de uma aminotransferase.

Figure 2- Biossíntese do aminoácido fenilalanina.



Fonte: Adaptado de Kruse; Trezzi; Vidal (2000).

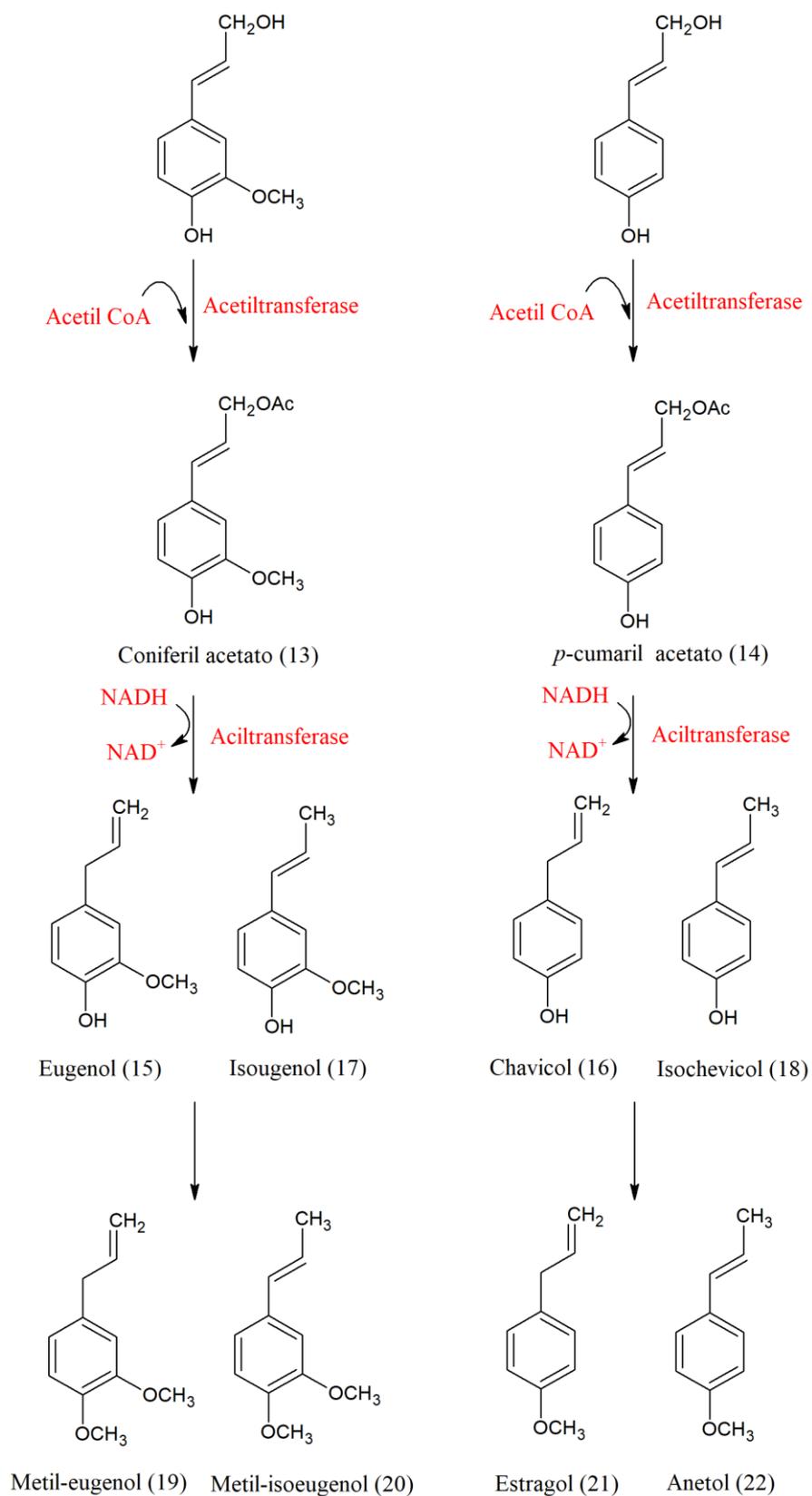
A partir do aminoácido fenilalanina, foi demonstrado por Yauk et al. (2017) que os passos biossintéticos iniciais de todos os fenilpropanoides são compartilhados com a via biossintética lignina-lignana até o estágio de formação dos álcoois monolignóis (FIGURA 3). Seguem em vias paralelas, tendo como precursores os álcoois cumarílico (11) e coniferílico monolignóis (12).

Figure 3-Biossíntese dos álcoois monolignóis.

Fonte: Adaptado de Muhlemann et al. (2014).

As últimas etapas da biossíntese dos fenilpropanóides foram elucidadas em espécie de flores silvestres, *Clarkia breweri* (MUHLEMANN et al., 2014), em frutas (ATKINSON, 2016) e em folhas de cenouras silvestres, *Daucus carota* (YAHYAA et al., 2019), as quais estão simplificadas na Figura 4. De maneira geral, a rota biosintética dos fenilpropanóides segue mediante acetilação dos álcoois coniferílico e cumarílicos, por meio de uma acetiltransferase dependente de Acetil-CoA (Etapa I). A cadeia lateral dos acetatos de coniferil (13) e cumaril (14) formados é sequentemente clivada por uma aciltransferase dependente de NADH, dando origem aos alilfenóis eugenol (15) e chavicol (16) e aos propenilfenóis isoeugenol (17) e isochavicol (18), compostos que se diferem apenas na posição da dupla ligação da cadeia lateral. A diversidade estrutural dos fenilpropanóides também advém da variação nos substituintes no anel benzeno, como nos compostos metil-eugenol (19), metil-isoeugenol (20), estragol (21) e anetol (22).

Figure 4-Biossíntese de Fenilpropanoides.



Fonte: Adaptado de Atkinson (2016) e Yauk et al. (2017).

2.3 Propriedades Biológicas do Eugenol

Eugenol é um dos fenilpropanoides mais abundantes na natureza. Denominado pela IUPAC de 4-alil-2-metoxifenol, apresenta os sinônimos metoxi-4-(2-propenil)fenol e 4-alilguaiacol. É identificado em várias plantas aromáticas como *Myristica fragrans* H. (noz-moscada), *Cinnamomum verum* J.P. (canela-verdadeira), *C. loureirii* N. (Canela Saigon), *Ocimum graminum* F. (manjeriçã) e *Ocimum basilicum* L. (manjeriçã-doce). Mas é naturalmente e abundantemente encontrado no óleo essencial de folhas, brotos e caules de cravo-da-índia, espécie denominada botanicamente como *Syzygium aromaticum* (*Eugenia caryophyllata* L. Merr. & Perry) pertencente à família Myrtaceae (FIGURA 5). Tem sido utilizado desde a antiguidade na medicina tradicional e na culinária (HOBANI et al., 2022; TEIXEIRA et al., 2018).

Figure 5-Cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* ou *Syzygium aromaticum*).



Fonte: Adaptado de Kewscience (2019)

O cravo-da-índia, especialmente seu óleo essencial, é bem conhecido e estudado por suas propriedades biológicas, que estão diretamente relacionadas com seu componente majoritário, o eugenol. Que é um antimicrobiano e anestésico natural, pesquisas in vitro e in vivo indicam que esse composto pode exibir uma série de outras atividades biológicas, como antioxidantes, anti-inflamatório, antiespasmódico, antidepressivo, antígenotóxico, anticarcinogênicos, protetor contra danos hepáticos entre outros (HUANG et al., 2019; KAUFMAN, 2015; LI et al., 2022; MA et al., 2019; SAHIN et al., 2017).

Tradicionalmente, o eugenol e o óleo de cravo-da-índia são conhecidos por terem sido utilizados no tratamento tópico de cáries dentárias, doenças gengivais, e dor de dente; são empregados na odontologia por suas propriedades analgésicas e antissépticas (HOBANI et al., 2022; SELL; CARLINI, 1976). De acordo com Sahin et al. (2017), o receptor GABAA é um dos alvos de medicamentos na terapia da dor, e o efeito analgésico do óleo essencial de cravo-da-índia pode ser parcialmente mediados por modulação positiva desse receptor por um

mecanismo alostérico dose-dependente (0,5 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Chandrika e Karumarathna (2022) atribuem o efeito anestésico local de ervas aromáticas à interação com íons Na^+ dependente de voltagemcanal. O eugenol pode atuar sobre o sistema nervoso central, proporcionando regulação da liberação de neurotransmissores, efeito neuroprotetor contra lesões oxidativas e antidepressivo (NISAR et al., 2021). E ainda há relatos de efeito gastoprotetor contra a toxicidade induzida por etanol, que envolve um mecanismo anti-inflamatório e antioxidante do eugenol (HOBANI et al., 2022).

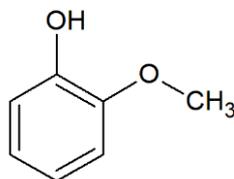
Uma área promissora para aplicação do eugenol é a ciência e tecnologia de alimentos, pois a molécula possui comprovada ação antioxidante, mais efetiva que os antioxidantes usuais (FERREIRA et al., 2019), e antimicrobiana, atuando no controle do crescimento microbiológico (HUANG et al., 2019; REQUENA; VARGAS; CHIRALT, 2019). Khare, Biswas e Sahoo (2014) avaliaram a atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de hortelã, EDTA, quitosana e eugenol em relação aos efeitos de cor e estabilidade oxidativa de macarrão instantâneo de frango. Os autores observaram que, entre os compostos analisados, o eugenol exibiu maior atividade antioxidante e conseguiu manter os valores de TBARS baixos em todo o período de armazenamento, além de apresentar impacto positivo na qualidade microbiológica e nos atributos sensoriais. Navikaite-Snipaitiene et al. (2018) desenvolveram uma embalagem antioxidante para carne fresca contendo óleo essencial de cravo-da-índia e eugenol. Os autores verificaram que as embalagens contribuíram para manter a coloração dos bifés e inibiram a oxidação lipídica de 3,33 mg de malondialdeído/Kg de carne para o controle a 1,00-1,22 mg de malondialdeído/Kg de carne nas embalagens tratadas com óleo essencial e eugenol durante 14 dias de armazenamento. Talón et al. (2019 a) avaliaram o efeito antioxidante de microcápsulas de eugenol em ácido oleico e amido, na preservação de óleo de girassol; os autores observaram que os filmes desenvolvidos com eugenol encapsulado foram altamente eficazes na prevenção da oxidação do óleo de girassol, por 53 dias de armazenamento a 30 °C, mantendo os valores de índice de peróxido, dienos conjugados e trienos baixos e constantes em comparação com o controle. Um filme comestível de quitosana, amido e eugenol também foi desenvolvido por Zheng et al. (2019), como uma barreira antimicrobiana e antioxidante, fornecendo novas formas para as indústrias de embalagens no desenvolvimento de materiais e embalagem ativas.

A aplicação de eugenol na preservação de alimentos como antioxidante é considerada segura (GRAS), uma vez que o eugenol possui baixa biodisponibilidade após processos digestivos. Michiels et al. (2008), estudando a cinética de degradação do eugenol e outros compostos aromáticos ao longo do trato gastrointestinal de leitões, observaram que todos os

compostos avaliados foram quase que completamente absorvidos no estômago e no intestino delgado de forma que são necessárias técnicas de encapsulação e de liberação controlada para que esse composto esteja biodisponível no organismo após a digestão (MAJEED et al., 2016).

A utilização do eugenol como antioxidante alimentício é, no entanto, limitada à algumas classes e culturas sociais e a alguns alimentos, devido ao forte aroma e sabor desse composto, capaz de modificar expressivamente as características sensoriais dos produtos em que é adicionado (RESENDE et al., 2017, TALÓN et al., 2019 b). De acordo com Schranz et al. (2017), o aroma e o sabor exibido pelas moléculas de eugenol é uma característica intrínseca de estruturas guaiacol (FIGURA 6) e de seus substituintes. Assim, uma alternativa para aplicabilidade de eugenol em alimentos é a sua modificação estrutural, visando reduzir ou eliminar as características sensoriais do composto, mantendo ou potencializando as propriedades físico-químicas e atividades biológicas do composto de partida (RESENDE et al., 2017).

Figure 6-Estrutura básica de derivados de Guaiacol.



Fonte: Do autor (2022).

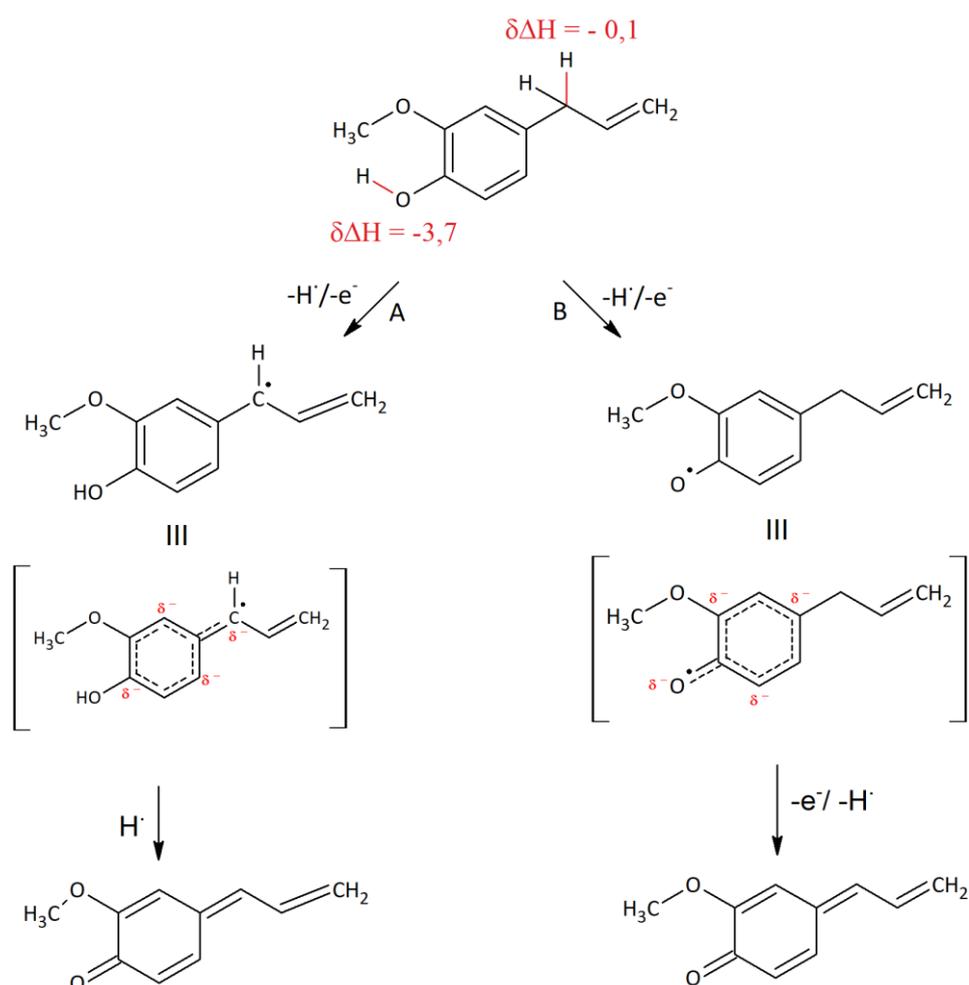
Por ser uma molécula pequena, de fácil obtenção, disponível comercialmente em grandes quantidades e com preço de mercado acessível (US \$ 5 por kg), o eugenol é um produto natural que oferece uma ampla gama de oportunidades de aplicação em síntese química (KAUFMAN, 2015). As características estruturais e a reatividade do eugenol tornam a molécula e seus derivados simples atrativa em empreendimentos sintéticos e no desenvolvimento de novos produtos em resposta às demandas públicas por compostos bioativos de origem natural.

2.4 Características Estruturais e Modificações na Molécula de Eugenol

As propriedades físico-químicas e biológicas de uma molécula dependem de sua estrutura química. O eugenol é um líquido oleoso à temperatura ambiente, lipofílico, volátil e odorífero. O composto exibe um forte odor de cravo, que é desejável em muitas matrizes alimentares, mas é um fator limitante para a aplicação dessa substância em outras matrizes.

Além dos atributos sensoriais, a estrutura química do eugenol é responsável por suas atividades biológicas, destacando-se a atividade antioxidante. De acordo com Li et al. (2017), a atividade antioxidante de um composto fenólico depende da força da ligação O-H, estando relacionada com a energia de dissociação da hidroxila fenólica. A atividade antioxidante do eugenol tem sido exaustivamente estudada e seu alto potencial está associado a dois sítios de doação de hidrogênios na molécula (BORTOLOMEAZZI et al. 2010; NISAR et al., 2021; YILDIZ et al., 2017), como mostrado na Figura 7. Ferreira et al. (2019), estudando a atividade antioxidante de óleos essenciais e seus majoritários, observaram que, além da hidroxila fenólica, o hidrogênio alílico do eugenol possui baixa energia de dissociação ($\delta\Delta H$) e pode participar do mecanismo de estabilização de radicais livres, com formação de quinonas (YILDIZ et al., 2017), dímeros ou ambos (BORTOLOMEAZZI et al. 2010).

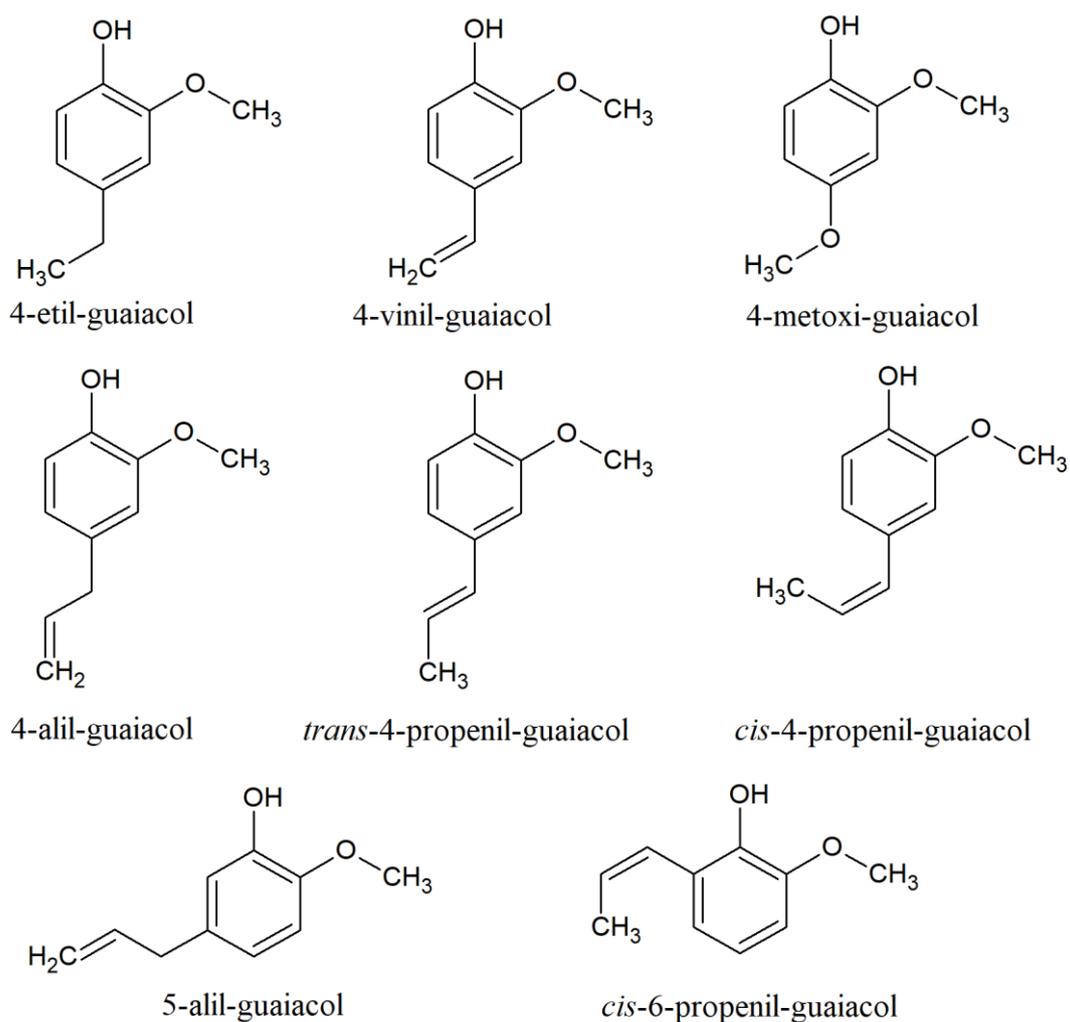
Figure 7- Sítios de doação de hidrogênio na molécula de eugenol.



Fonte: Adaptado de Ferreira et al. (2022).

Apesar de possuir grande potencial como antioxidante, o eugenol não é considerado uma opção viável para a indústria, devido às suas características sensoriais. O odor característico dessa molécula está relacionado à sua estrutura básica. Os derivados de guaiacol são abundantemente encontrados na natureza e exalam odores característicos de defumado, cravo-da-índia e baunilha. Schranz et al. (2017) avaliaram a influência da estrutura química nas qualidades e odores dos derivados de guaiacol; os autores observaram que o odor de cada derivado está relacionado, além da estrutura básica, com a posição dos substituintes alquila e metoxila. Além disso, de acordo com os autores, o odor de cravo-da-índia pode ser detectado nos compostos que apresentam substituintes etil, vinil, propenil, alil, metoxil nas posições 4, 5 e 6 do anel, conforme apresentado na Figura 8.

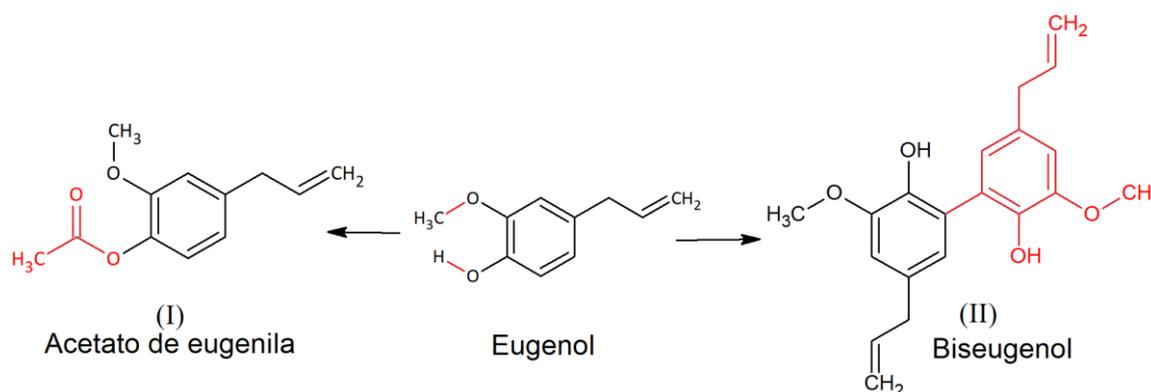
Figure 8-Derivados guaiacol com aroma de cravo.



Fonte: Do autor (2022).

Como os grandes responsáveis pelo odor do eugenol são a porção guaiacol e a posição de seus substituintes, a modificação nesse esqueleto pode resultar em diminuição ou eliminação do odor e até mesmo na potencialização de suas atividades biológicas. A acetilação e a dimerização (FIGURA 9) são alternativas simples e de baixo custo que podem confirmar a responsabilidade da hidroxila fenólica para o efeito antioxidante e avaliar a influência da lipofilicidade na interação dos novos derivados com substratos lipídicos.

Figure 9-Modificações simples na molécula de eugenol.



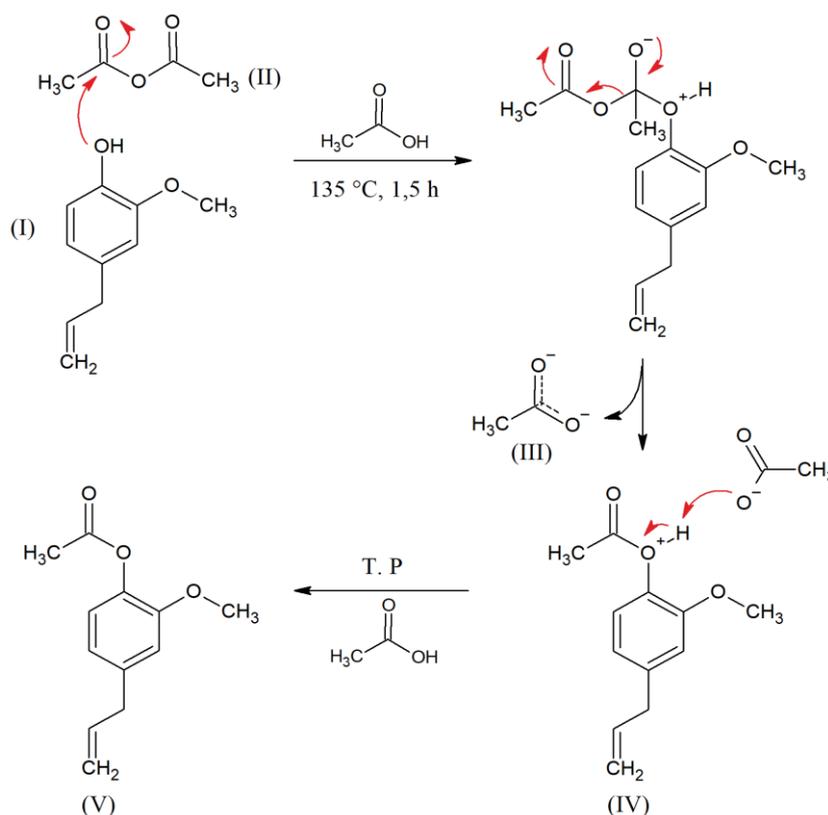
Fonte: Do autor (2022).

A acilação ou acetilação de álcoois e fenóis em ésteres com ácidos carboxílicos e anidridos acéticos é uma transformação química fundamental na produção de intermediários importantes e produtos químicos biologicamente ativos (SATO et al., 2007). Os ésteres de eugenol, incluindo acetato de eugenila (I) (acetato de 4-aliil-2-metoxifenol), têm sido intensamente investigados devido às suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antitumorais e potenciais larvicidas sobre *Aedes egypti*. O acetato de eugenila é um derivado natural do eugenol, obtido em menor abundância (<10 %) no óleo essencial de cravo-da-índia. É um líquido oleoso amarelo pálido e, de acordo com a Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (FAO), Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), é considerado seguro para ser usado em produtos alimentícios (MACHADO et al., 2017; MUSTHAFA et al., 2016). A obtenção sintética do acetato de eugenila tem sido feita com e sem utilização de catalizadores. Diversos autores estudaram e otimizaram a produção desse composto a partir do eugenol. De acordo com Sato et al. (2007), as versões catalíticas dessa reação estão sendo investigadas para substituir a corrente não estequiométrica dos processos de acilação que geram grandes quantidades de resíduos de ácido e solvente. Os autores desenvolveram uma nova e eficiente acilação de álcoois sem catalisadores ácidos ou básicos, que envolve sistema de micro reação com água

subcrítica (subH₂O). Os ésteres desejados foram obtidos com excelentes rendimentos (>93%) e com 100% de seletividade em temperaturas entre 200 e 250 °C. Álvarez-Calero, Jorge e Massanet (2016) obtiveram um rendimento de 100% na conversão do eugenol a acetato de eugenila utilizando anidrido acético, piridina em diclorometano à temperatura ambiente, com 24 horas de agitação. Uma rota de síntese ainda mais simples, rápida, economicamente viável e menos tóxica foi explorada por Wang et al. (2012), baseada em Sato et al. (2007), que sintetizaram o acetato de eugenila a partir da reação do eugenol com anidrido acético em ácido acético sob refluxo (1,5 h), obtendo um rendimento de 97 %.

A acetilação do eugenol por anidrido acético, tendo ácido acético como solvente, envolve um mecanismo de substituição nucleofílica em carbono acila como mostrado na Figura 10. A hidroxila fenólica do eugenol (I) sofre o ataque nucleofílico à carbonila do anidrido acético (II), resultando na formação de uma nova ligação (O-C) e na eliminação de uma molécula de acetato (III), com formação de um intermediário protonado (IV). Em uma etapa de transferência de prótons (T. P), o hidrogênio é retirado por ação de uma espécie carregada negativamente, provavelmente o próprio grupo abandonador, e o novo produto é formado (V).

Figure 10- Provável mecanismo de acetilação do eugenol.



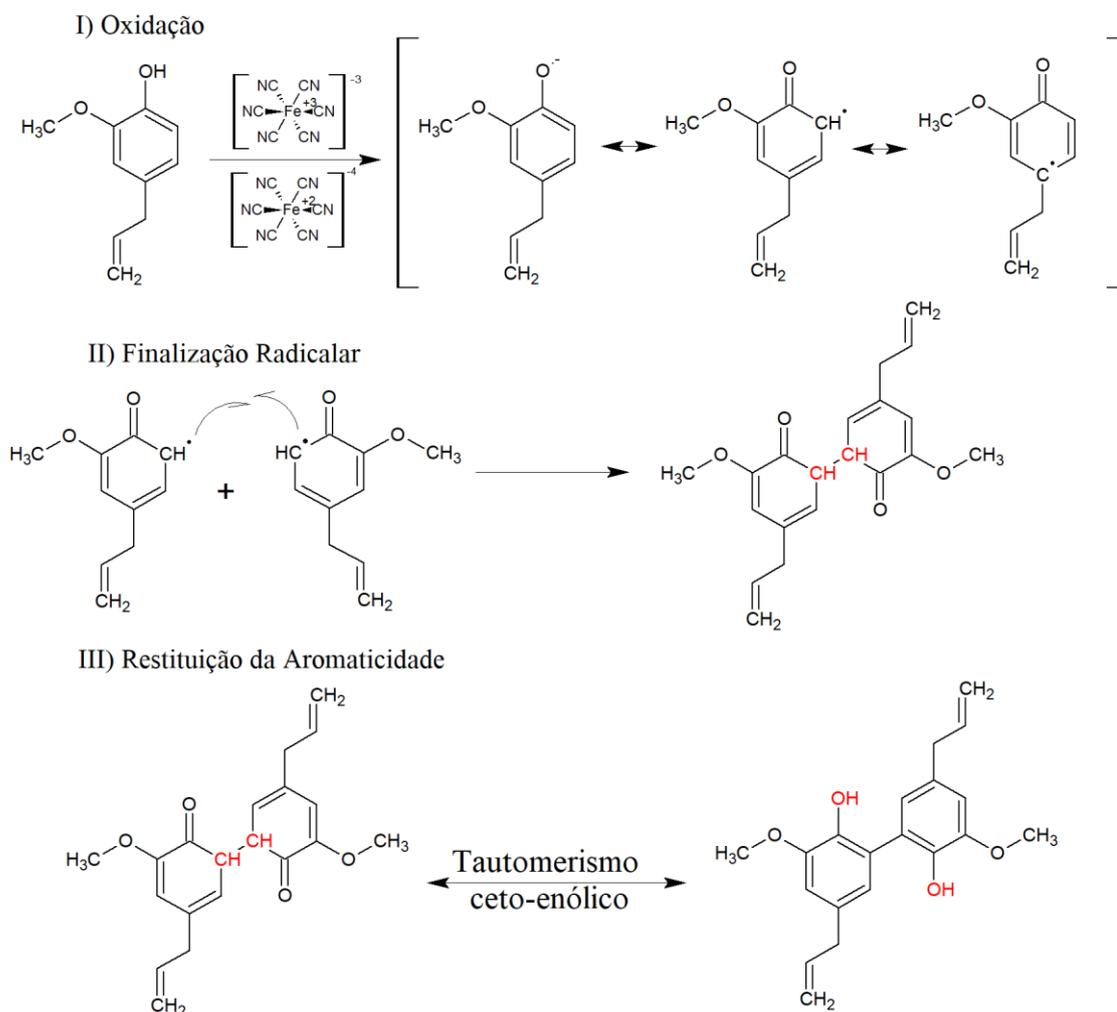
T. P- Transferência de próton. Fonte: Do autor (2022).

De acordo com Li et al. (2017), a força da ligação OH é influenciada pelo caráter doador ou retirador de densidade eletrônica dos substituintes no anel. Além disso, a atividade antioxidante de um composto é influenciada positivamente pela presença de substituintes volumosos em posições vizinha ao grupo –OH (GUNTERO et al., 2018; MATHAIYAN et al., 2021; OGATA et al., 2000) Assim, a dimerização do eugenol (FIGURA 9) também pode ser explorada na obtenção de hidroxilas fenólicas impedidas, pois, além da substituição na posição C6 do anel, a reação pode promover aumento na atividade antioxidante pela adição de mais dois sítos de doação de hidrogênios.

O bis-eugenol (II) foi inicialmente desenvolvido como um antioxidante mais potente que o eugenol, pois, em altas concentrações, o eugenol atua como pró-oxidante, efeito que não ocorre para seu dímero, que, além de antioxidante, atua como um potente inibidor de respostas inflamatórias e alérgicas (MURAKAMI et al., 2003; OGATA et al., 2000). A possibilidade de dimerização do eugenol abre novas alternativas de síntese de fenóis com menor citotoxicidade e maior potencial antioxidante. O bis-eugenol pode ser sintetizado pela oxidação radicalar do eugenol e vem sendo utilizado como matriz para produção de materiais poliméricos com diferentes propriedades, como novos termofixos (GUZMÁN et al., 2019). Diferentes métodos para a obtenção do bis-eugenol já foram utilizadas. Ogata et al. (2000) realizaram rápida dimerização pela oxidação do eugenol com uma mistura de sulfato de ferro (FeSO_4) e peróxido de hidrógeno (H_2O_2) em piridina a 60 °C. Guzmán et al. (2019) obtiveram o dímero de eugenol, com um rendimento de 98%, pela mistura de eugenol, acetona e hidróxido de amônio e pelo gotejamento de uma solução aquosa saturada de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

De acordo com Bortolomeazzi et al. (2010), a oxidação radicalar de eugenol (I), evidenciada por GC-MS e HPLC-MS, leva a formação majoritária (98%) de seu *ortho* dímero, bis-eugenol. Desse modo, é possível prever que a síntese proposta por Guzmán et al. (2019), que se baseia no acoplamento oxidativo do eugenol (I) produzido pelo sistema redox ferricianeto-ferrocianeto, segue um mecanismo radicalar, com a junção de dois radicais eugenol em uma etapa de finalização (II) (FIGURA 11). Apesar da alta energia de ativação do encontro e reação de dois radicais, o acoplamento *ortho* (C6-C6) para formação do bis-eugenol é favorecido pela diminuição de energia decorrente da restituição da aromaticidade por um mecanismo de tautomerismo ceto-enólico (III).

Figure 11-Provável mecanismo de oxidação radicalar do eugenol.



Fonte: Do autor (2022)

2.5 Técnicas Espectroscópicas para Determinação de Compostos Orgânicos

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, determinando os níveis de energia de átomos ou moléculas, permitindo obter informações sobre estrutura molecular e ligações químicas. Informações espectroscópicas são essenciais para elucidação, identificação e confirmação estrutural de novos compostos sintéticos ou isolados de plantas, drogas, toxinas ou vitaminas, entre outros compostos de interesse. O processo de elucidação estrutural por métodos espectroscópicos é dedutivo e, em casos mais simples, um ou mais experimentos espectroscópicos podem fornecer conclusões estruturais satisfatórias. Entre as técnicas de identificação iniciais e mais comuns, estão a ressonância magnética nuclear de (RMN), infravermelho (IV) e espectrometria de massas. Entretanto, vários outros núcleos, como carbono-13 e experimentos mais sofisticados de RMN multipulso e bidimensional, podem ser utilizados na elucidação de moléculas complexas e de grande

interesse. A espectroscopia de ultravioleta e informações de espectrometria de massas são frequentemente necessárias. Em casos mais complexos, aquisição de dados de Raman ou quíópticos também podem ser importantes nesse processo (LAMBERT et al., 1998).

A utilização do espectro no infravermelho em conjunto com outros dados espectrais pode determinar a estrutura de moléculas, uma vez que dificilmente dois compostos diferentes apresentam o mesmo espectro no infravermelho, com exceção dos pares de enantiômeros (LAMBERT et al., 1998; PAVIA; LAMPMAN; KRIS, 1996; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1979). O comprimento de onda da espectroscopia no infravermelho varia de 0,78 μm a 300 μm , uma extensão dividida em três seções: infravermelho próximo (0,75-2,5 μm), infravermelho médio (2,5-25 μm , com número de onda 400-4000 cm^{-1}) e infravermelho distante (25-300 μm). A premissa básica dessa técnica é que quando a luz infravermelha em comprimentos de onda específicos corresponde aos níveis de energia vibracionais da molécula em estudo é incidida, a energia é absorvida e a amplitude dos movimentos vibracionais das ligações na molécula aumenta. O processo de absorção é quantizado gerando um espectro de absorção (CHEN; YU, 2021; LAMBERT et al., 1998). Os espectros no infravermelho fornecem uma variedade de informações sobre a estrutura de uma molécula como sua simetria e a identidade de grupos funcionais. As absorções de cada tipo de ligação (N-H, C-H, O-H, C-X, C=O, C-O, C=C, C=N) e as vibrações de muitos grupos funcionais sempre dão origem a picos e bandas características dentro de faixas bem definidas nos espectros no infravermelho, sendo particularmente útil na identificação de funcionalidades (PAVIA; LAMPMAN; KRIS, 1996; LAMBERT et al., 1998). A inclusão da transformada de Fourier na espectroscopia de infravermelho (FTIR) foi um avanço para a técnica, pois possibilitou sua aplicação para um campo mais amplo com alta sensibilidade, precisão e resolução (CHEN; YU, 2021).

A combinação de dados espectroscópicos no infravermelho e RMN muitas vezes é suficiente para determinar completamente a estrutura de uma molécula. Vasconcelos et al. (2022) caracterizaram as modificações químicas realizadas em um dímero de ácido graxo por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C).

2.6 Atividade Antioxidante

Reações de oxidação e redução estão presentes em toda parte, nos organismos animais ou vegetais, nos alimentos e nos diversos materiais utilizados no cotidiano. Essas reações fazem parte da vida e são extremamente importantes. Entretanto, no seu decorrer, formam-se espécies altamente reativas, conhecidas como radicais livres. De acordo com Olszowy et al.

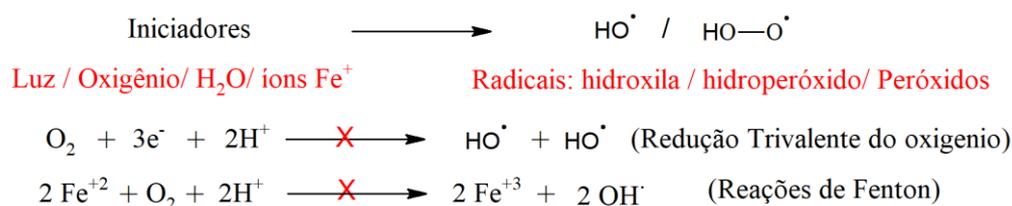
(2019), o impacto do excesso de radicais livres em humanos e animais se manifesta em diferentes doenças crônicas não transmissíveis, entre elas o câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas relacionadas ou não à idade. Nos alimentos e em produtos industriais, as reações radicalares levam à degradação e deterioração deles pela oxidação de lipídios com a formação de produtos secundários indesejáveis, ocasionando grandes perdas econômicas (WANG et al., 2020a).

A oxidação ou peroxidação lipídica é um processo radicalar que compreende pelo menos a três etapas, sendo elas: a inicialização (I), a propagação de cadeia (II) e a finalização (III) (FIGURA 12). O processo de degradação de lipídios e outras biomoléculas pode ser desencadeado, de acordo com Amorati, Foti e Valgimigli (2013), por algumas espécies radicalares que, independentemente de sua origem ou estrutura, são capazes de reagir com o substrato orgânico (lipídico ou proteico). Geralmente abstrai átomos hidrogênios ($H\bullet$), produzindo um radical alquil ($R\bullet$), que reagirá a uma taxa controlada para formar um radical peroxil ($ROO\bullet$). Em sequência, o radical peroxil ataca outra molécula de substrato, produzindo hidroperóxidos de $ROOH$ (substrato oxidado) e um novo radical alquil. A reação em cadeia prossegue por muitos ciclos antes que duas espécies radicalares se extingam na etapa de finalização, com formação de compostos tóxicos ao organismo. Entre os produtos das reações de peroxidação, o malondialdeído é um aldeído extremamente reativo e tóxico, estando frequentemente associado ao desenvolvimento de patologias, como doenças cerebrais e câncer (SERINER et al., 2022, WANG et al., 2022). Por ser uma molécula pequena e lipossolúvel, o malonaldeído pode atravessar facilmente a barreira hematoencefálica e induzir disfunção proteica ou reticulação (SERINER et al., 2022), além disso, a reatividade das carbonilas que contribuem para formação de iminas com as bases purina e pirimidina das fitas do DNA, levando a um efeito de cross link do DNA na presença de malonaldeído, um dano que desempenha um papel fundamental na carcinogênese (WANG et al., 2022).

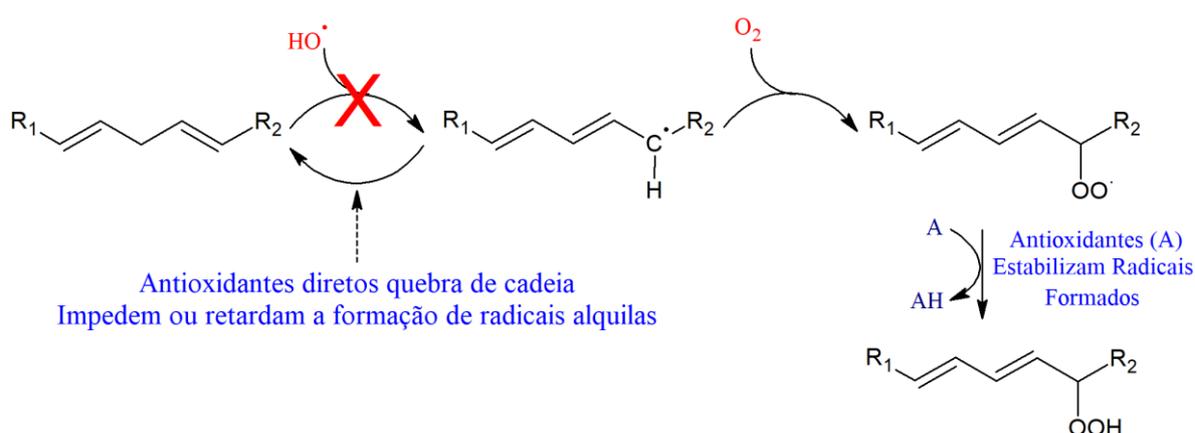
Devido ao impacto negativo dos radicais livres em humanos, animais e produtos industriais, as investigações para encontrar substâncias antioxidantes, que protejam os organismos vivos da oxidação lipídica, são realizadas visando a aumentar a vida útil e manter por maior tempo possível a integridade dos produtos ricos em lipídios, proteínas, carboidratos e outras moléculas orgânicas que compõem tecidos animais ou vegetais (OLSZOWY et al., 2019).

Figure 12-Etapas do processo radicalar de oxidação lipídica e ação de antioxidantes

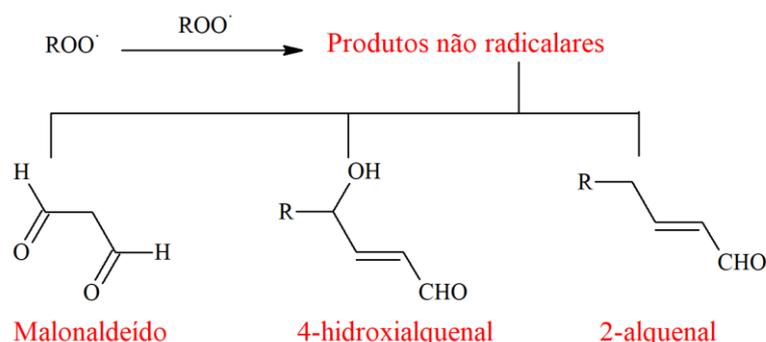
(I) Iniciação: Formação de espécies reativas de oxigênio

Antioxidantes diretos preventivos : Quelantes de Radicais OH^\bullet e ions Fe^{+2}

(II) Propagação: Degradação de substratos Orgânicos



(III) Finalização: Formação de Produtos de Oxidação

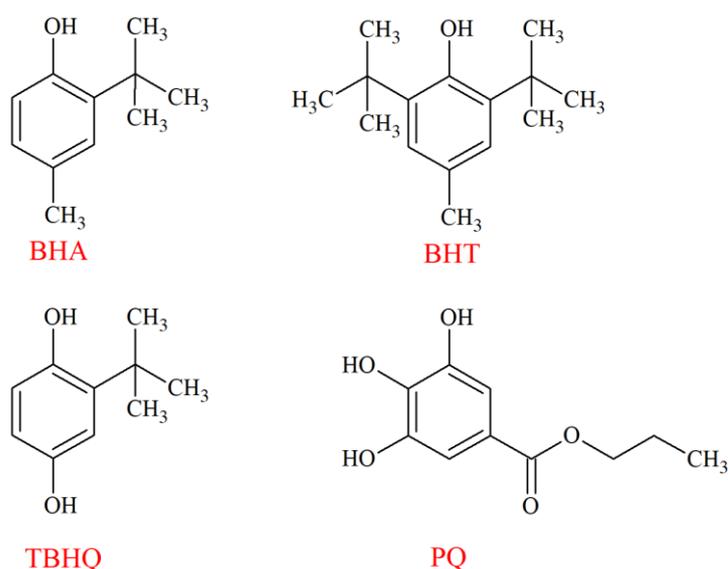


Fonte: Adaptado de Amorati, Foti e Valgimigli (2013) e Dukić et al. (2012).

Antioxidantes são compostos capazes de impedir, retardar e inibir a oxidação de substratos orgânicos, mesmo quando usados em quantidades muito pequenas (<1%, geralmente $1-1000 \text{ mg L}^{-1}$) em comparação com a quantidade de material a ser protegido (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013). São classificados como enzimáticos e não enzimáticos. Entre os não enzimáticos, destacam-se os sintéticos butil hidroxianisol (BHA), 2,6-ditertbutil-4-hidroxitolueno (BHT), tertbutilhidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG), largamente utilizados nas indústrias alimentícias e cosméticas (FIGURA 13)

(OLSZOWY et al., 2019; WANG et al., 2020a). Entretanto, a segurança da maioria dos antioxidantes sintéticos apresenta controversias, e cada vez mais, acredita-se que esses compostos tenham um efeito nocivo no corpo humano (MOHAMMADZADEH-AGHDASH et al., 2019). Assim, os antioxidantes de origem natural tem sido exaustivamente pesquisados, especialmente os compostos fenólicos, bem como seus derivados.

Figure 13-Estrutura química dos antioxidantes sintéticos.



Fonte: Do autor (2018)

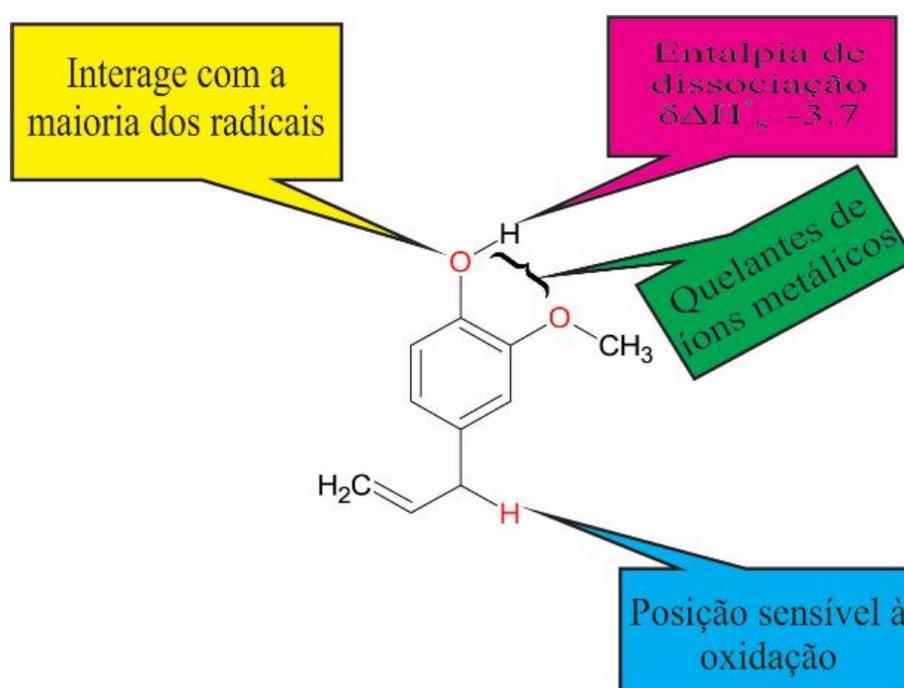
Os antioxidantes são classificados, também, em diretos e indiretos, dependendo de seu mecanismo de ação. Aqueles que agem sobre o processo de iniciação, retardando ou impedindo a formação de espécies radicalares (enzima catalase e quelantes de metais) são antioxidantes diretos preventivos. Já os compostos que atuam bloqueando e inibindo as reações de propagação, estabilizando os radicais formados, são os antioxidantes diretos de “quebra de cadeia”. De acordo com Amorati, Foti e Valgimigli (2013), o fato de um composto reagir com espécies radicalares não o caracteriza como antioxidante direto; para isso são necessários que a espécie radicalar esteja realmente envolvida na etapa de propagação, com formação de radical peroxil. A reação entre o composto e o radical presente maior velocidade que a reação do radical com o material a ser protegido (lipídios), e os produtos da reação sejam espécies incapazes de propagar a reação em cadeia.

Os terpenos com características fenólicas e fenilpropanoides são exemplos de antioxidantes diretos, como demonstrado por Ferreira et al. (2019). Os autores avaliaram a influência da estrutura química na atividade antioxidante de óleos essenciais e seus

componentes majoritários e verificaram que as estruturas fenólicas do carvacrol e eugenol, são propícias para atuação como antioxidantes diretos preventivos e de quebra de cadeia.

A estrutura química dos antioxidantes diretos preventivos favorece a quelação de metais livres, como íons ferro (II). Já os antioxidantes diretos de quebra de cadeia são capazes de doar um ou mais hidrogênios ($H\bullet$) ou elétrons ao radical, estabilizando-se pela deslocalização eletrônica, de forma a extinguir a propagação da cadeia, como pode ser observado na estrutura do fenilpropanoide, eugenol (FIGURA 14) (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013; FERREIRA et al., 2019; SANTIAGO et al., 2016).

Figure 14-Relação estrutura-atividade do eugenol.



Fonte: Adaptado de Ferreira et al. (2019).

Os antioxidantes indiretos não exibem comportamento antioxidante relevante, mas aumentam as defesas antioxidantes em sistemas vivos, induzindo a expressão ou aumentando a atividade de enzimas antioxidantes, como fazem os cofatores e alguns íons metálicos. No geral, produtos naturais podem se comportar como antioxidantes indiretos, principalmente hidrocarbonetos terpênicos. Existem também os antioxidantes “mistos”, que atuam pelos dois mecanismos, aumentando as defesas antioxidantes (indiretos) e executando um mecanismo direto (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013).

Apesar da diversidade, a estrutura química dos antioxidantes possui certa similaridade, como a deslocalização eletrônica proveniente de duplas ligações conjugadas, grupamentos

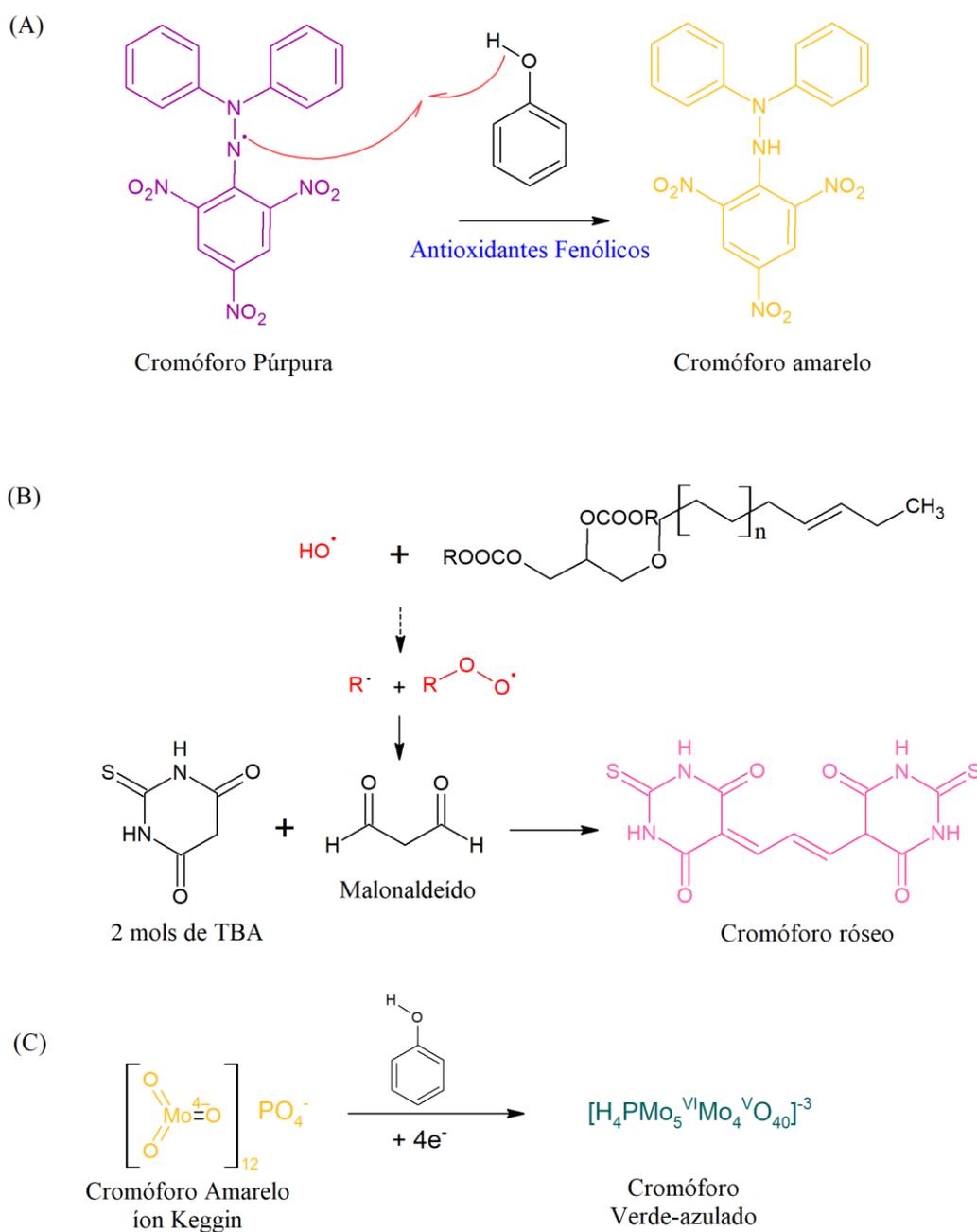
hidroxila ligados a anéis aromáticos e/ou hidrogênios alílicos. A importância dessas espécies no controle de radicais livres tem impulsionado a pesquisa, no sentido da descoberta e síntese de novos agentes antioxidantes para as indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, que apresentem menor toxicidade ao ser humano.

A determinação da atividade antioxidante utilizando métodos colorimétricos é clássica; existem vários testes *in vitro* capazes de descrever o poder antioxidante de espécies vegetais e sintéticas. Em geral, esses testes consideram a variação na resposta de absorvância como parâmetro para inferir tal propriedade. Os ensaios antioxidantes *in vitro* podem ser divididos em dois grupos: (i) os que avaliam a peroxidação lipídica e quelantes de metais e (ii) aqueles que medem a capacidade de eliminação de radicais livres e redução de metais. Na avaliação da peroxidação lipídica, geralmente utilizam ovos ou lipossomas como matrizes oxidáveis e monitora-se a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nos ensaios que medem a capacidade de eliminação de radicais livres, o método de estabilização do radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH) é o mais utilizado, sendo, geralmente, um dos primeiros testes aplicados na determinação antioxidante de compostos de origem natural (AKAR; KÜÇÜK; DOĞAN, 2017; BOULANOUAR et al., 2013).

No método de estabilização de radicais DPPH, o radical recebe elétrons ou átomos de hidrogênio de uma substância que tenha caráter antioxidante, de forma que o radical DPPH (coloração púrpura) é reduzido, formando 2,2-difenilpicrilhidrazina (coloração amarela) com consequente descoloração da solução (FIGURA 15A).

O ensaio de TBARS é empregado na avaliação de antioxidantes protetores de substratos lipídicos, geralmente aplicado a produtos alimentícios altamente oxidáveis (GHANI et al., 2017). Já no ensaio de lipossomas, a matriz oxidável é uma vesícula microscópica com uma ou mais camadas lipídicas, e avalia-se a habilidade dos antioxidantes em sistemas vivos e complexos, protegendo membranas biológicas (REIS et al., 2010). Nesses ensaios, os lipídios presentes em gemas de ovos ou nos lipossomas são expostos a condições de peroxidação lipídica na ausência e presença de antioxidantes. Os compostos formados no decorrer do avanço das reações de peroxidação, como o malonaldeído, interagem com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico para formar um cromóforo de cor rosa, que absorve em 532 nm (FIGURA 15B). Em todos os ensaios colorimétricos, a atividade pode ser observada pelo decréscimo da absorvância na região de absorção característica dos cromóforos formados.

Figure 15-Cromóforos formados na estabilização de radicais DPPH (A) e na condensação de malonaldeído com TBA (B).



Fonte: Adaptado de MOON e SHIBAMOTO (2009).

Prieto, Pineda e Aguilar (1999) desenvolveram, caracterizaram e otimizaram um método espectrofotométrico para a determinação quantitativa da capacidade antioxidante hidrossolúvel e lipossolúvel de vários antioxidantes, incluindo a vitamina E. O método do fosfomolibdênio segue um mecanismo de transferência de elétrons ou transferência de átomos de hidrogênio do composto analisado, que promove a redução dos íons molibdênio (VI) a molibdênio (V) com subsequente formação de um complexo fosfato verde/Mo(V) em pH

ácido. A absorvância do complexo azul-esverdeado pode ser lida em 695 nm. A cor azul-esverdeada resulta da redução do molibdato de amônio em um óxido conhecido como íon Keggin $[H_3PO_4(MoO_3)_{12}]$ em condições ácidas.

O íon Keggin resultante é, então, reduzido em $[H_4PMo_8^{VI}Mo_4^{VO}_{40}]^{3-}$ na presença de um antioxidante (Sadeer et al., 2020). O esquema básico reacional é apresentado na Figura 15C. De acordo com os autores, a necessidade de um agente redutor para produzir Mo(V) a partir do Mo(VI) proporciona o monitoramento da atividade antioxidante de matrizes complexas ao longo do tempo e auxilia na compreensão das relações estrutura-atividade de espécies antioxidantes conhecidas e desconhecidas. A simplicidade e o baixo custo do método fazem com que esse ensaio seja uma alternativa aos métodos já disponíveis para a avaliação da capacidade antioxidante total.

2.7 Antioxidantes em Produtos Alimentícios

O valor nutritivo, a qualidade e a vida útil de produtos alimentícios são aspectos importantes para as empresas de alimentos, sendo o uso de aditivos alimentares essencial para que a indústria atenda à demanda de uma grande quantidade e variedade de produtos. Substâncias químicas, naturais ou sintéticas, são adicionadas a vários alimentos com a finalidade de alterar suas propriedades físico-químicas e sensoriais. Entre esses compostos, estão os antioxidantes, conservantes, emulsificantes, modificadores de textura e intensificadores de cor e aroma (GHABRAIE et al., 2016; WONG, 2018). Entretanto, nos últimos anos, a indústria alimentícia tem sido desafiada a acompanhar as mudanças nos hábitos alimentares de seus consumidores, que cada vez mais buscam por compostos percebidos como mais saudáveis, naturais e bioativos. Com isso, no processo de reduzir a quantidade de aditivos químicos, abre-se um vasto campo de estudos, principalmente na área de produtos naturais, para o desenvolvimento de novos aditivos.

A oxidação lipídica é um grande problema para a indústria alimentícia, uma vez que pode ser desencadeada por ação da luz, temperatura e do oxigênio do ar. As espécies reativas de oxigênio (EROs) aceleram o processo de degradação dos alimentos, limitando a qualidade e aceitabilidade deles, devido a modificações sensoriais decorrentes da perda de cor, sabor, qualidade nutricional e do desenvolvimento de odores e de compostos prejudiciais à saúde (CANABADY-ROCHELLEAL et al., 2018; RIBEIRO et al., 2019). Além disso, a segurança alimentar da maioria dos antioxidantes usados na indústria tem sido questionada. Bauer et al. (2001) avaliaram a influência da administração de BHT em camundongos e observaram uma resposta inflamatória acompanhada da formação de tumores pulmonares. Vandghanooni et al.

(2013) avaliaram a citotoxicidade do BHA e verificaram clara fragmentação na cromatina e nos anéis de DNA dentro do núcleo de células tratadas com o antioxidante. Apesar dos sais de nitrito serem indispensáveis no processo de cura de derivados cárneos e no controle microbiológico contra cepas bacterianas de *Clostridium* e ainda inibirem a oxidação lipídica, Gassara et al. (2016) ressaltaram que a adição desses compostos deve ser limitada, uma vez que, em doses elevadas, há riscos para a saúde, devido à formação de derivados N-nitroso, compostos com alto potencial carcinogênico. Antioxidantes naturais, extraídos de várias fontes vegetais, têm sido considerados uma alternativa atraente para essa situação conflitante (CUNHA et al., 2018; RIBEIRO et al., 2019). Novos compostos, técnicas e tecnologias têm sido desenvolvidas para reduzir as quantidades de antioxidantes, adicionados em alimentos; destacando-se embalagens ativas com liberação controlada de princípios ativos na superfície dos alimentos, nanoestruturas e compostos bioativos incorporados em sistemas de distribuição manométricos (DOMÍNGUEZ et al., 2018; JAFARIZADEH-MALMIRI et al., 2019; MINNELLI et al., 2019).

2.8 Carnes

Os diferentes tipos de Carne são considerados alimentos de grande importância na nutrição humana e na economia de um país, estando presentes na dieta da maioria dos países desenvolvidos, devido ao seu alto teor de proteína, aminoácidos e ácidos graxos essenciais, vitaminas do complexo B, B12 e cobalamina (RIBEIRO et al., 2019). De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) de 18 de agosto de 2020, publicado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), carnes são as massas musculares e os demais tecidos que as acompanham, incluída ou não a base óssea correspondente, procedentes das diferentes espécies animais, julgadas aptas para o consumo pela inspeção veterinária oficial (MAPA, 2020). Sendo definida como carne *in natura*, toda carne que não recebeu nenhum tipo de tratamento, procedimento e/ou adição de ingredientes que vise a sua conservação, exceto a aplicação de frio (resfriada ou congelada), para mantêr suas características naturais (BRASIL, 2019).

O Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada notificou que as exportações brasileiras de carne bovina sinalizaram um novo recorde em 2021. O volume de carne bovina (*in natura*) exportado somou 902 mil toneladas e contribuiu para uma receita de R\$ 4,65 bilhões de reais, valor que foi 27,6% superior ao de junho de 2021 e 27,7% superior ao de julho de 2020 (CEPEA, 2021). Em 2022, o Escritório de Assuntos Agropecuários acredita que o setor bovino brasileiro deverá expandir sua produção de gado em 2,5% e que as exportações

de carne bovina aumentarão em 12%. Além disso, o mercado de suínos também deve aumentar sua produção em 1,8%, atingindo 45,3 milhões de toneladas (GAIN Report, 2022). No setor de aves, espera-se um recorde com produção de 14,72 milhões de toneladas, crescendo 3% devido à forte demanda externa e ao aumento do consumo interno. O Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango. Estima-se que 4,17 milhões de toneladas de aves sejam exportadas em 2022 (GAIN Report, 2021).

O mercado de carnes é altamente rentável no Brasil, mas os rendimentos financeiros desse setor estão diretamente relacionados com as características nutricionais e com a qualidade do produto exportado. Entretanto, carnes *in natura* são facilmente oxidáveis por serem constituídas basicamente de proteínas musculares (contráteis, actina e miosina, do citoesqueleto e tecido conjuntivo) e gordura animal (RIBEIRO et al., 2019). A perecibilidade desse produto cria um campo de estudo rico e variado em que diversas tecnologias, formulações e conservantes naturais têm sido estudados e desenvolvidos. Alvarez-Parrilla et al. (2014) avaliaram o efeito antioxidante de condimentos mexicanos tradicionais em correlação à quantidade de compostos fenólicos presentes nos extratos de pimenta-chilaca, urucum e molho-toupeira na prevenção da oxidação lipídica da carne suína picada. Os autores sugerem que esses condimentos são úteis para prevenir a oxidação lipídica da carne durante o armazenamento. Zhang, Wu e Guo (2016) avaliaram o efeito antioxidante e antimicrobiano de alecrim e cravo-da-índia na conservação de carne de frango. Os autores verificaram que os extratos das especiarias foram altamente eficazes contra o crescimento microbiano e a oxidação lipídica apresentando potencial como antioxidante natural.

2.8.1 Carne Mecanicamente Separada

Os processados de carne são alimentos amplamente consumidos. Além dos aspectos sensoriais apreciáveis, possuem preço relativamente baixo, quando comparados aos cortes tradicionais de carne *in natura*. A carne mecanicamente separada (CMS) é um dos derivados cárneos de grande importância no mercado. É definida pela Instrução Normativa (IN) nº 4, de 31 de março de 2000 como a carne obtida por processo mecânico de moagem e separação de ossos de animais de açougue (aves, bovinos e suínos) aprovados para consumo humano e destinada à elaboração de produtos cárneos específicos (BRASIL, 2000). A CMS é obtida por meio de um processo que envolve a trituração mecânica das carcaças para formar uma pasta de carne e osso, seguida pela passagem da mistura por uma tela fina ou superfície ranhurada para separar a carne do resíduo ósseo (FIGURA 16). De acordo com WUBSHET et al., (2019), a desossa mecânica é amplamente praticada na indústria de processamento de

aves e suínos para separar carne picada comestível de carcaças que já passaram por um processo de filetagem padrão. O processo causa ruptura das células, resultando em um material com composição química diferente da matéria-prima original. Essa composição varia de acordo com o tipo de máquina, a localização anatômica dos ossos, as espécies animais, a temperatura e a quantidade de carne magra. Em geral, as CMS são constituídas de tecidos musculares, conectivos e adiposos e exibem alto teor de gordura e heme proteínas (EFSA, 2013). Apresentam maior teor de gordura devido à incorporação de lipídios existentes na medula óssea e níveis mais elevados de cálcio, resultantes do conteúdo ósseo residual, além de existirem relatos da presença de partículas de cartilagem em CMS de frango (NAKANO; OZIMEK; BETTI, 2012; MÓRI et al., 2006; WUBSHET et al., 2019).

Figure 16- Esquema geral da produção de carnes mecanicamente separadas.



Fonte: Do autor (2022).

A CMS de frango surgiu como uma alternativa ao desperdício de partes menos nobres do frango, já que, no mercado de carnes de frango, o corte mais aceito e exportado é o peito com ou sem osso. Assim, a obtenção de CMS de frango possibilita que parte desse resíduo seja reaproveitado na alimentação humana, incorporados em produtos já existentes, sendo uma fonte de proteína de qualidade e de baixo custo (MÓRI et al., 2006). De acordo com o Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA), na IN n° 4 de 31 de março de 2000 estabelece que a CMS de frango será obtida apenas de dorso e pescoço, não sendo permitida a utilização de cabeça, pata e pés. Para garantir a qualidade e o valor nutricional, a CMS deve conter no mínimo 12 % de proteína e no máximo 30% de gordura e 1,5% de cálcio (em base seca); 98% do diâmetro dos ossos devem ter tamanho máximo de 0,5 mm e o índice de peróxido não deve ultrapassar 1 mEq KOH por kg de gordura. Após obtida, pode ser armazenada por 24 horas a 4 °C ou por 72 horas a 0 °C ou por 90 dias a -18 °C, com espessura

máxima de 15 cm. A CMS obtida pode ser utilizada em diferentes porcentagens na formulação de mortadelas (60%), mortadela tipo Bologna (20%), mortadela de carne de ave (40%), linguiça cozida (20%), linguiça tipo calabresa (20%), linguiça portuguesa (20%), paio (20%), salsicha (60%), salsicha tipo Viena (40%), salsicha tipo Frankfurt (40%), salsicha de carne de aves (40%), almondega cozida (30%), hambúrguer cozido (30%) e fiambre (10%) (BRASIL, 2000).

Apesar de ser uma matriz importante para a indústria de alimentos e estar presente como substituto da carne *in natura*, a CMS é altamente oxidável e mais susceptível à contaminação microbiológica (EFSA, 2013). A ruptura nas membranas musculares no processo de fabricação da CMS expõe as membranas lipídicas a íons metálicos e facilita as interações entre ácidos graxos insaturados e pró-oxidantes (ANSARIAN et al., 2022). De acordo com Saricaoglu e Turhan (2019), carnes tratadas termicamente são ainda mais vulneráveis à oxidação, uma vez que enzimas antioxidantes no músculo, como catalase e superóxido dismutase, perdem sua atividade, ao passo que as proteínas contendo ferro, mioglobina e hemoglobina tornam-se uma fonte de íons ferro (II) catalítico. Com isso, a CMS pode ser oxidada até mesmo durante o processo de elaboração (moagem, mistura e cozimento), o que compromete sua qualidade e aumenta a demanda por aditivos e conservantes para estabilização das reações oxidativas e microbiológicas (ANSARIAN et al., 2022; SAMADI et al., 2012). Entretanto, a Legislação brasileira não prevê a utilização de antioxidantes e conservantes em CMS. A despeito disso, muitos trabalhos têm utilizado essa matriz para avaliação da atividade antioxidante em alimentos, principalmente para produção de mortadelas e salsichas.

Trindade, Contreras e Felício (2006) avaliaram a qualidade e estabilidade oxidativa de mortadelas formuladas com CMS de galinhas poedeiras com adição de misturas de eritorbato de sódio como pré-cura, relatando que a pré-cura da CMS resultou em um produto com menor rancidez e melhor coloração ao longo do tempo de estocagem. Trindade et al. (2008) adicionaram nitrito e eritorbato de sódio em CMS de diferentes origens estocadas por 99 dias a -18 °C, e observaram que a adição dos antioxidantes em CMS reduziu a oxidação lipídica nas CMS tratadas. Com o intuito de melhorar a estabilidade oxidativa de lipídios e os atributos sensoriais, Mohamed e Mansour (2012) incorporaram óleo essencial de manjerona e alecrim na formulação de hambúrgueres fabricados com CMS de aves e verificaram que a adição dos óleos essenciais reduziu significativamente o índice de TBARS durante o armazenamento, além de melhorarem as características sensoriais dos produtos. Saricaoglu e Turhan (2019) avaliaram proteínas de CMS incorporadas com óleos essenciais de tomilho e de cravo-da-

índia na qualidade de salaminhos tratados termicamente. Os autores observaram que as variações no peso, pH, índice de TBARS e proliferação bacteriana foram menores no grupo de salaminhos contendo CMS incorporada com os óleos essenciais.

2.8.2 Mortadela

A mortadela é um dos produtos cárneos mais aceitos e apreciados em todo o mundo. Seu consumo é popular, principalmente por ser um produto elaborado a partir de vários tipos de animais, e pela possibilidade de utilização de CMS, em substituição à carne *in natura*, tornando o produto economicamente mais acessível à população de baixa renda. Em muitas regiões do Brasil, a mortadela é comumente servida como acompanhamentos e tem importante papel nutricional na dieta (GUERRA et al., 2011; HORITA et al., 2011). A IN n° 4, de 31 de março de 2000 estabelece que mortadela é um produto cárneo industrializado, obtido de uma emulsão das 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. As mortadelas apresentam diferentes classificações, dependendo da composição da matéria-prima e das técnicas de fabricação, conforme apresentado na Quadro 1. Todos os diferentes tipos de mortadela devem apresentar teor de 65% de umidade, um mínimo de 12% de proteínas, sendo permitida a adição de no máximo 4% de proteínas não cárneas, devendo ser lácteas no caso das mortadelas Bologna e Italiana. O teor de gordura máximo permitido é de 30%, com exceção das mortadelas Bologna e Italiana, que podem apresentar 35% de gordura (BRASIL, 2000).

O processo de emulsificação que dá origem à mortadela é uma importante tecnologia no processamento de produtos cárneos e é realizado pela emulsificação de proteínas, gorduras e água. Nesse processo, a proteína desempenha um papel vital na estabilidade da emulsão, na capacidade emulsificante e de retenção de água, reduzindo perdas durante o cozimento, melhorando as propriedades de textura e estrutura, e conferindo sabor e suculência ao produto (KIM et al., 2021; LEE et al., 2020). As proteínas miofibrilares (solúveis em solução salina) e sarcoplasmáticas (solúveis em água) têm função emulsificante. A mioglobina nas proteínas sarcoplasmáticas contribui para a coloração vermelha do produto cárneo e inibe a desnaturação térmica da actina e miosina durante o cozimento (KIM et al., 2020). De acordo com Horita et al. (2011), produtos cárneos emulsionados como a mortadela requerem concentrações específicas de NaCl nas formulações originais para promover a extração de proteínas miofibrilares, especialmente a actomiosina complexa, que são solúveis apenas em soluções de alta força iônica. As proteínas miofibrilares extraídas na presença de NaCl são as

principais responsáveis pela capacidade de retenção de água, emulsificação, propriedades de ligação de gordura na massa e pela formação de géis estáveis na etapa de cozimento. A presença de NaCl na formulação de produtos cárneos emulsionados desempenha importantes funções do ponto de vista tecnológico, físico-químico, oxidativo e microbiológico (LEÃES et al., 2021). De acordo com Cichoski et al. (2019), a formação de emulsões depende da energia mecânica aplicada no momento de sua formulação, ou seja, depende do misturador, moinho coloidal ou homogeneizador utilizado que necessita de alta intensidade para produzir as mudanças estruturais nas proteínas. Os autores ressaltam ainda que o controle de temperatura durante o processo de formulação e cozimento é uma tarefa importante, pois leva a grandes mudanças estruturais nas proteínas, que podem influenciar na estabilidade, rendimento e textura da emulsão.

Quadro 1. Classificação de Mortadelas baseadas na composição da matéria-prima de acordo com Instrução Normativa SDA-4.

Classificação	Tipo de carne	CMS % max.	Miúdos	Peles, tendões e Gordura % max.	Amido % max.	Carboid. % max.	Cálcio % BS max
Mortadela	Diferentes espécies de animais de açougue	60	Diferentes espécies de animais de açougue *	10	5	10	0,9
Mortadela Tipo Bologna	Bovina e/ou suína e/ou ovina	20	Bovino e/ou suíno e/ou ovino*	10	5	10	0,3
Bologna	Carnes bovina e/ou suína e toucinho**	0	0	0	0	3	0,1
Mortadela Italiana	Diferentes espécies de animais de açougue e toucinho**	0	0	0	0	3	0,1
Mortadela de Carne de Ave	Carne de ave	40	Fígado, Moela e Coração de aves	10	5	10	0,6

*Estômago, Coração, Língua, Fígado, Rins, Miolos. **Toucinho em cubos deve ser aparente.
Fonte: Brasil (2000).

Por ser um produto cárneo industrializado, a RDC N° 272, de 14 de março de 2019, prevê o uso de aditivos químicos como antioxidantes, conservantes, aromatizantes, realçador de sabor, entre outros, que prolongam a vida útil desses produtos e garantem a segurança

microbiológica (BRASIL, 2019). A aplicação de antioxidantes retarda as reações oxidativas e a formação de produtos tóxicos em produtos cárneos. Os antioxidantes utilizados na indústria e previstos na Legislação são ascorbato de sódio, ascorbato de cálcio, ascorbato de potássio, ácido eritórbito, ácido isoascórbico, eritorbato de sódio, isoascorbato de sódio, galato de propila, butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), ácido cítrico, D-alfa-tocoferol e mistura concentrada de tocoferóis. Os conservantes, por sua vez, atuam no controle microbiológico, sendo os sais de nitrito os mais utilizados, pois, além de controlar o crescimento bacteriano, também desempenham importante papel na cura. A cura é um método tradicional de conservação de produtos cárneos e ocorre pela adição de sais de nitrito e/ou do seu precursor nitrato, que também auxiliam no desenvolvimento dos atributos indispensáveis e distintivos dos produtos cárneos curados, como cor rosa, sabor, aroma e na redução da oxidação lipídica nesses produtos. Além disso, o nitrito é extremamente importante para a qualidade e segurança alimentar, pois inibe a germinação de endósporos e a multiplicação de células vegetativas de *Clostridium botulinum* (GUIMARÃES et al 2022; PINELLI et al., 2021). Entretanto, adição de sais de nitrito em produtos cárneos tem sido tema de debates, uma vez que o nitrito e agentes nitrosantes, como ácido nitroso e óxido de nitrogênio, reage facilmente com aminas secundárias formando N-nitrosaminas, muitas das quais são potentes carcinógenos. De fato, a ocorrência de N-nitrosaminas é comum em produtos cárneos curados, como salsichas, carnes assadas, bacon e peixes salgados, mesmo com a limitação de 150 mg de sais de nitrito por Kg de carne (LU et al., 2022; NIKLAS et al., 2022). Diante dessas preocupações, há um aumento na demanda por ingredientes naturais que visam a substituir o nitrito sintético, levando ao surgimento de um mercado para produtos “naturais” ou “clean label”, que são percebidos pelos consumidores como produtos mais saudáveis (GUIMARÃES et al 2022). De acordo com Guimarães et al. (2021), o desafio está na fabricação de produtos cárneos curados Clean label que sejam equivalentes aos produtos convencionais, sendo necessários substitutos naturais ao nitrito e nitrato que apresentem capacidade de cura. Assim, cada vez mais, pesquisas são realizadas no intuito de encontrar novas moléculas capazes de atuar como antioxidante, conservante e agente de cura em produtos alimentícios, buscando a redução dos aditivos previstos na Legislação, pela associação ou substituição total desses por produtos de origem natural, ou derivados sintéticos de menor impacto toxicológico.

2.9 Análise de Alimentos

A análise de alimentos desempenha importante papel científico e social, uma vez que avalia a qualidade e segurança dos alimentos, essencial na saúde e confiança do consumidor. A avaliação microbiológica, analítica e físico-químicas aplicada a alimentos pode ser decisiva para prevenir ou resolver problemas de saúde pública, detectando ameaças, incluindo deterioração, contaminação, alérgenos e adulteração e também para definir e complementar ações de vigilância sanitária. E também uma ferramenta nas inovações tecnológicas de alimentos (dos SANTOS et al., 2022; TORIBIO et al., 2021; ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008).

Atualmente, a análise de alimentos não se concentra apenas na avaliação de nutrientes (lipídios, vitaminas, proteínas ou carboidratos), mas também investiga a presença de contaminantes, adulterantes ou substâncias ilícitas, consideradas nocivas. Atua também no controle de qualidade de sistemas de produção em larga escala ou escala orgânica. Apesar de extremamente importante, a análise de alimentos é uma tarefa desafiadora, devido à grande variedade de matrizes de amostras e os compostos a serem analisados poderem diferir em propriedades físico-químicas, bem como em níveis de concentração. Interferentes estão frequentemente presentes e, às vezes, os compostos-alvo existem em baixos níveis de concentração, o que torna obrigatórios métodos analíticos altamente sensíveis e seletivos (TORIBIO et al., 2021). Os métodos convencionais de análise de alimentos geralmente envolvem técnicas de via úmida, como a titulação, destilação, métodos colorimétricos que utilizam espectroscopia de UV-Vis, filtração, secagem, pesagem, avaliação de pH, avaliações enzimáticas, eletroforese, entre outros. Utilizam-se também técnicas analíticas instrumentais como espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia líquida de alto desempenho acoplada à espectrometria de massa e outros detectores (dos SANTOS et al., 2022).

2.9.1 Análise centesimal

O alimento pode ser dividido em seis frações com componentes orgânicos e inorgânicos. Entre os componentes orgânicos, encontram-se as gorduras, proteínas, fibras e carboidratos. A água e os minerais, por sua vez, são considerados componentes inorgânicos. Os procedimentos analíticos que visam a fornecer informações das características de composição, estrutura, propriedades físico-químicas e atributos sensoriais são essenciais na produção de alimentos seguros (LEITE, 2019). A análise centesimal de produtos cárneos cozidos é extremamente importante, uma vez que, de acordo com Djikeng et al. (2022), o

processamento térmico pode levar a alterações químicas que afetam o conteúdo de carboidratos, proteínas, lipídios e minerais dos alimentos. Além disso, o teor de umidade geralmente desempenha um papel importante na manutenção da qualidade da carne e, conseqüentemente, dos produtos cárneos. E o conhecimento do teor de gorduras, proteínas e carboidratos está relacionado com a qualidade sensorial e o valor nutricional do alimento para o consumidor (MOHAMMED et al., 2020).

A análise centesimal de um alimento consiste em uma série de experimentos que se iniciam com a retirada de umidade do material por meio da secagem em estufa a 105 °C, determinada por método gravimétrico e corresponde à perda em peso sofrida pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água é removida. Essa matéria seca é subdividida em matéria orgânica (lipídios, carboidratos e proteínas) e matéria inorgânica (cinzas). A matéria inorgânica é determinada após a queima da matéria orgânica em mufla, o resíduo da incineração ou cinzas é o nome dado ao resíduo obtido por aquecimento de um produto em temperatura de 550 a 570 °C. A gordura pode ser extraída da matéria orgânica por meio de solventes orgânicos, como o éter etílico, usando métodos de extração a quente (Soxhlet), com formação de um extrato etéreo. As proteínas são determinadas pelos seus componentes nitrogenados pelo método de Kjeldahl, que se baseia em uma digestão ácida, na qual o nitrogênio da amostra é transformado em amônio (NH_4^+), sendo posteriormente separado por destilação e finalmente dosado por titulação. Após todas as determinações, o teor de carboidratos pode ser mensurado por diferença entre todos os outros componentes presentes no alimento (LEITE, 2019; ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008).

2.9.2 Análise de Oxidação lipídica, Voláteis e Oxidação de Proteínas

A principal causa da deteriorização de carnes e de produtos cárneos é a rancidez oxidativa, envolvendo a oxidação de ácidos graxos insaturados, proteínas e pigmentos, a qual, pode ser acelerada por processos como redução do tamanho das partículas e conseqüente mistura de componentes e aeração do sistema; cozimento que contribui para desnaturação de enzimas antioxidantes com liberação de ferro ou a adição de sais que aumentam a atividade catalítica do ferro e reduz a atividade de enzimas (ARAUJO, 1995). Assim, o monitoramento das reações oxidativas em alimentos é importante para determinar a vida útil, a segurança alimentar e as melhores condições de armazenamento.

A avaliação da estabilidade oxidativa é um importante parâmetro para a determinação da qualidade da gordura. A detecção e quantificação de peróxidos orgânicos têm sido um indicador muito sensível do estágio inicial de oxidação de gorduras. Sua detecção indica a

formação dos compostos responsáveis pelo sabor e odor rançosos no produto alimentício (ARAÚJO, 1995; CICHOSKI et al., 2021). Existem diferentes métodos para a determinação do índice de peróxido, dos vários testes disponíveis, aquele baseado na reação com iodeto em condições ácidas tem sido aceito como padrão, pois apresenta uma estequiometria 1:1 entre os íons I_3^- e os grupos $-OOH_2$. Entretanto, esse método é sensível ao oxigênio e à luz, e seu uso é limitado à padronização de métodos e matrizes menos complexas. O ensaio denominado PCA-FOX (oxidação ferrosa do ácido perclórico em laranja de xilenol) foi desenvolvido como uma alternativa às limitações do método padrão. Ele se baseia na redução de hidroperóxidos por íons Fe^{2+} e posterior complexação do Fe^{3+} gerado com laranja de xilenol. O ensaio é rápido e livre de sensibilidade ao oxigênio, e a absorbância desenvolvida é estável. As principais desvantagens desse método são a falta de precisão estequiometria entre as quantidades de hidroperóxido e Fe^{3+} e a alta sensibilidade a alterações no pH. Essa última limitação pode ser contornada com a utilização de ácido perclórico, em vez de ácido sulfúrico no ensaio de hidroperóxido de laranja férrico-xilenol (GAY; GEBICKI, 2002).

Para mensurar a extensão da deterioração oxidativa de lipídios em um produto alimentício, processado ou não em condições controladas de armazenamento, utilizam-se ensaios de avaliação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que avalia o conteúdo de aldeídos formados durante os processos oxidativos. De acordo com Jo e Ahn (1998), o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) está entre os mais utilizados para quantificar os produtos da oxidação lipídica em carnes e produtos cárneos, por ser simples e rápido. O ensaio determina a presença e quantifica malondialdeído (MDA), um subproduto secundário da oxidação lipídica. A determinação de MDA em carnes e produtos cárneos tem sido amplamente empregada para avaliar a estabilidade oxidativa e está correlacionada com as características sensoriais do produto avaliado (da SILVA et al., 2019; de CARVALHO et al., 2020; MASSINGUE et al., 2018). A avaliação do índice de TBARS em carnes apresenta grandes dificuldades e limitações, como a interação do MDA com aminoácidos, proteínas e glicogênio, constituintes dos alimentos, além da presença de pigmentos vermelhos que também dificultam a quantificação específica do MDA. Assim, os métodos de preparo das amostras cárneas antes da análise são de extrema importância para a mensuração correta do índice de TBARS. Essa preparação consiste em extrair o MDA do produto a ser analisado com soluções aquosas ácidas para posteriormente reagí-lo com TBA. Geralmente, nessa extração utiliza ácido tricloroacético (TCA) ou ácido perclórico, além de processos de filtração para eliminação de interferentes (JO; AHN, 1998; PIKUL; LESZCZYNSKI; KUMMEROW, 1989; RAHARJO; SOFOS; SCHMIDT, 1992).

Aldeídos, álcoois, ácidos, cetonas, benzenos e hidrocarbonetos são compostos voláteis produzidos principalmente a partir de reações de oxidação lipídica e proteica (KIM et al., 2008). Esses compostos contribuem para o desenvolvimento de odores desagradáveis em produtos cárneos e influenciam na sua qualidade, com efeitos diretos nas propriedades sensoriais. Diferentes fatores contribuem para a formação de compostos voláteis em alimentos, entre eles destacam-se a atividade de microrganismos, a oxidação de lipídios, alguns ingredientes utilizados em formulações, o tempo e condições de armazenamento, sendo a oxidação de lipídios o principal fator que leva à perda das propriedades sensoriais de um produto e o desenvolvimento do odor e sabor de ranço (CICHOSKI et al., 2021; de CARVALHO et al., 2020).

A análise de compostos voláteis, por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas, auxilia no monitoramento dos processos de oxidação lipídica. O método de microextração em fase sólida, do inglês, Solid Phase Micro Extration (SPME), utilizado na análise é considerado uma ferramenta qualitativa para estudar o efeito de diferentes tratamentos na mudança do perfil volátil de produtos alimentícios (de CARVALHO et al., 2020; MONTANARI et al., 2018). De acordo com de Carvalho et al. (2020), essa técnica permite a determinação de compostos específicos derivados da decomposição do hidroperóxido de forma mais precisa e auxilia na identificação dos marcadores do processo oxidativo. O hexanal é o maior indicador de oxidação lipídica em produtos cárneos, mas existem outros voláteis que são altamente específicos, como o oct-2-enal, pentanal e (E)-hept-2-enal, oriundos da oxidação do ácido linoleico e linolênico e araquidônico. A oxidação lipídica do ácido oleico, por sua vez, gera os aldeídos heptanal, octanal, nonanal e non-2-enal. Além disso, pequenas quantidades de álcoois (oct-1-en-3-ol e pentan-1-ol) e cetonas (2,6-dimetil-heptan-4-ona) podem ser detectadas (de CARVALHO et al., 2020; DOMÍNGUEZ, et al., 2019; MONTANARI et al., 2018).

A oxidação de proteínas é considerada um processo de deterioração contínua durante o armazenamento de carnes frescas e processadas, e está associada ao aumento da dureza da carne e à redução da capacidade de retenção de água. A ligação entre a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas ainda não é clara, principalmente em matrizes complexas, como em produtos cárneos. Sabe-se, entretanto, que o mecanismo de oxidação de proteínas também ocorre por meio de reações em cadeia, iniciadas ou catalisadas por radicais livres. A oxidação de proteínas, no entanto, apresenta com maior complexidade de via e maior variedade de produtos de oxidação, como a hidroxilação aromática, oxidação de tiol e a formação de grupos carbonilas nas cadeias laterais de aminoácidos. Entre os produtos de oxidação proteica, o

radical carbonila é normalmente utilizado como indicador para avaliar a progressão das reações oxidativas em diferentes alimentos musculares (de CARVALHO et al., 2020; SOGLIA; PETRACCI; ERTBJERG, 2016).

De acordo com Soglia, Petracci e Ertbjerg (2016), a detecção de carbonilas ligadas a proteínas em músculo e carne é um desafio devido à presença de proteínas com baixa solubilidade em miofibrilas e tecido conjuntivo. Tradicionalmente, esses compostos têm sido detectados espectrofotometricamente após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas ligadas a proteínas com absorvância em 370 nm. Existem, ainda, técnicas com base em ensaios de espectrofluorometria ou na medição dos marcadores de oxidação específicos na forma dos produtos carbonílicos α -aminoalifáticos e semialdeídos γ -glutâmicos. A oxidação de proteínas derivadas do músculo também pode ser estudada imunoquimicamente após derivatização com DNPH, usando anticorpos anti dinitrofenil. Entretanto, o ensaio colorimétrico ainda apresenta mais vantagens, como baixo custo e equipamentos mais acessíveis, apesar de o método ser robusto e exigir atenção à metodologia. No método colorimétrico, a detecção de carbonilas depende da reação adequada entre esses grupamentos com o reagente DNPH. No método tradicional, as proteínas são precipitadas com TCA antes da derivatização com DNPH. Mas, de acordo com Soglia, Petracc e Ertbjerg, (2016), a solubilidade das proteínas pode ser aumentada antes da derivatização por meio de tratamentos que incluem a adição de 5% de dodecil sulfato de sódio (SDS), incubação a 100 °C por 10 min e banho ultrassônico a 40 °C por 30 min.

A oxidação de proteínas é medida pela formação de carbonilas; quanto maior o teor de carbonilas, maior o grau de oxidação do produto alimentício. JOKANOVIĆ et al. (2020) avaliaram a oxidação de proteínas pela geração de carbonilas durante o armazenamento refrigerado de costeletas de porco pré-cozidas marinadas, e o maior teor de carbonilas proteicas ao final do período de armazenamento foi observado para o controle. O óleo essencial e o extrato (obtido a 100 bar, 40 °C) de segurelha foram os melhores antioxidantes contra a oxidação de proteínas. Os resultados de Wang et al. (2020b) em carne de coelho sob diferentes temperaturas de armazenamento mostraram que os níveis de carbonila aumentaram para todos os grupos ao longo do período de armazenamento. Contrariamente, de Carvalho et al. (2020) observaram uma diminuição dos níveis de carbonila total em linguças de cordeiro durante os primeiros seis dias de armazenamento, seguido de um aumento progressivo até o final do tempo de armazenamento.

2.9.3 Análise de Cor

O sistema de coordenadas CIELAB auxilia no monitoramento da cor, por meio das coordenadas L*, a* e b*, que juntas, descrevem a cor de carnes e produtos cárneos durante o período de armazenamento, processamento e estocagem. Sendo que, os valores de L* medem da clareza para a escuridão de uma amostra; a* é uma medida do vermelho para o verde, e b* representa a variação do azul para o amarelo (BAK et al., 2019).

A cor e a estabilidade da cor são características importantes de carnes e produtos cárneos, pois estimulam a percepção sensorial de aparência agradável e contribui para uma aceitação positiva do consumidor, fazendo referência à qualidade e validade do produto (ONGARATTO et al., 2021; WANG et al., 2020b). A cor está intimamente ligada à concentração, estado químico e físico da mioglobina (heme-proteína) e do ligante anexado a ela (O₂, CO ou NO), e também da estrutura superficial da carne. O controle redox da mioglobina é a chave para obter a cor brilhante e atraente. O estado químico da mioglobina e suas proporções relativas provocam uma variação na cor de vermelho-púrpura da desoximioglobina (com a forma reduzida do ferro), a vermelho brilhante da forma oxigenada da oximioglobina, até o marrom oxidado da metamioglobina (com a forma oxidada de ferro) (BAK et al., 2019; MODZELEWSKA-KAPITUŁA; ŻMIJEWSKI, 2022; ONGARATTO et al., 2021).

Existe uma forte relação entre a oxidação de lipídios e pigmentos que levam a modificações na cor de produtos cárneos, e essa alteração indesejável sinaliza processos de deterioração. A progressão da oxidação lipídica e eventual acúmulo de seus produtos podem favorecer a oxidação de heme-proteínas, uma vez que os aldeídos alteram a estabilidade redox da mioglobina que é oxidada, induzindo uma mudança da cor vermelho-cereja brilhante para tons acastanhados (TOMASEVIC et al., 2021). Por isso, o processo de cura, com sais de nitrito/nitrato é tão importante para a indústria na manutenção da cor de produtos cárneos e de carnes curadas. O nitrito é um forte oxidante, que reage com Fe⁺² e Fe⁺³ da mioglobina e da metamioglobina, respectivamente, para formar uma cor vermelho-rosada atraente aos consumidores. Essa cor é permanente em embalagens e condições de exibição normais, mas pode desaparecer ao longo do tempo. Nos últimos anos, tem havido uma crescente demanda por alimentos percebidos como mais saudáveis, com menores teores de aditivos, especialmente sais de cura. Apesar de ainda não existir um substituto para os sais de cura, pesquisas têm se desenvolvido nessa direção, sendo que um dos corantes naturais mais utilizados em produtos cárneos é o ácido carmínico, que é extraído de corpos secos de fêmeas de *Dactylopius coccus*, uma espécie de inseto de cochonilha (ONGARATTO et al., 2021).

2.9.4 Análise sensorial

A relação entre alimentação, saúde e prazer nunca esteve tão em alta. Cada vez mais o setor industrial e a pesquisa em ciência e tecnologia de alimentos são desafiados a desenvolver produtos percebidos como mais saudáveis, preservando ou melhorando sua qualidade sensorial. Nesse sentido, a avaliação sensorial é uma etapa importante no desenvolvimento de novos produtos, reformulações e melhorias nutricionais, sendo essencial para entendimento das preferências dos consumidores. A ciência sensorial fornece informações sobre as características descritivas e hedônicas dos produtos alimentícios, com uma ampla variedade de métodos e técnicas, viabilizando dados quantitativos e qualitativos que ajudam a nortear a pesquisa e decisões de marketing e negócios (PURRIÑOS et al., 2022; SALDAÑA et al., 2021; AURIEMA et al., 2022).

Entre as metodologias de análise sensorial, o grupo de foco é uma análise qualitativa que fornece uma avaliação sensorial afetiva, pois possibilita aos participantes explicar suas atitudes e preferências. Essa análise busca identificar opiniões e conceitos repetidos pelos participantes, identificando atributos e a percepção do avaliador (MINIM, 2013; LEMES, GIULIANI e BESERRA, 2021). A aplicação de um grupo de foco exige um planejamento considerando os objetivos do estudo, um roteiro contendo perguntas para a discussão a ser realizada e o recrutamento de consumidores do produto a ser avaliado. Uma sessão de grupo de foco é conduzida por um moderador e assistentes que gravam e fazem anotações sobre as respostas obtidas. As amostras podem ser apresentadas na forma que melhor as represente. Os resultados são analisados de forma qualitativa (DUTCOSKY, 2011). De acordo com Stone, Bleibam e Thomas (2020), é indicada a participação de seis a oito provadores em um grupo de foco. Lemes, Giuliani e Bezerra (2021) recomendam sessões com oito a doze participantes. O mais importante é que a sessão deve ocorrer em local confortável e que possibilite a interação dos participantes. Diferentes produtos podem ser avaliados sensorialmente por meio de grupo de foco. Speight et al. (2019) realizaram grupos de foco para avaliar as características de queijo cheddar pré-embalados. Pinelli et al. (2021) utilizaram o grupo de foco para analisar mortadelas adicionadas de óleos essenciais. Já Silva et al. (2017) avaliaram a aplicação de xarope de raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) adicionado a iogurte. Os roteiros de cada avaliação contaram com perguntas sobre a frequência de consumo do produto em avaliação, preço que estaria disposto a pagar, embalagem, cor, ingredientes, alegações de benefícios à saúde, intensão de compra, entre outras questões, como aroma, aparência, sabor e textura.

REFERÊNCIAS

- AKAR, Z.; KÜÇÜK, M.; DOĞAN, H. A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**. v. 32, n. 1, p. 640-647, Jan, 2017.
- ALAMGIR, A. N. M. Medicinal, non-medicinal, biopesticides, color-and dye-yielding plants; secondary metabolites and drug principles; significance of medicinal plants; use of medicinal plants in the systems of traditional and complementary and alternative medicines (CAMs). In: **Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1**. Springer, Cham, 2017. p. 61-104.
- ÁLVAREZ-CALERO, J. M.; JORGE, Z. D.; MASSANET, G. M. TiCl₄/Et₃N-Mediated Condensation of Acetate and Formate Esters: Direct Access to β-Alkoxy-and β-Aryloxyacrylates. **Organic letters**. v. 18, n. 24, p. 6344-6347, Dec, 2016.
- ALVAREZ-PARRILLA, E. et al. Antioxidant activity and prevention of pork meat lipid oxidation using traditional Mexican condiments (pasilla dry pepper, achiote, and mole sauce). **Food Science and Technology**. v. 34, n. 2, p. 371-378, Jun, 2014.
- AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 61, n. 46, p. 10835-10847, Nov, 2013.
- AMPOFO, J. O.; NGADI, M. Stimulation of the phenylpropanoid pathway and antioxidant capacities by biotic and abiotic elicitation strategies in common bean (*Phaseolus vulgaris*) sprouts. **Process Biochemistry**, v. 100, p. 98-106, 2021.
- ANSARIAN, E. et al. Nanoemulsion-based basil seed gum edible film containing resveratrol and clove essential oil: In vitro antioxidant properties and its effect on oxidative stability and sensory characteristic of camel meat during refrigeration storage. **Meat science**, v. 185, p. 108716, 2022.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química De Alimentos: Teoria E Prática**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 335p.
- ATKINSON, R. G. Phenylpropenes: Occurrence, distribution, and biosynthesis in fruit. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 66, n. 10, p. 2259-2272, Dec, 2016.
- AURIEMA, B. E. et al. Fat replacement by green banana biomass: Impact on the technological, nutritional and dynamic sensory profiling of chicken mortadella. **Food Research International**, v. 152, p. 110890, 2022.
- BAK, K. H. et al. Effect of high pressure treatment on the color of fresh and processed meats: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 2, p. 228-252, 2019.
- BASER, K. H.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. CRC press; 2015.

BAUER, A. K. et al. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. **Toxicology**. v. 169, n. 1, p. 1-5, Nov, 2001.

BORTOLOMEAZZI, R. et al. Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. **Food chemistry**. v. 118, n. 2, p. 256-65, Jan., 2010.

BOULANOUAR, B. et al. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. **Industrial Crops and Products**, Philadelphia, v. 46, p. 85-96, Apr, 2013.

BRASIL – Diário Oficial da União (DOU). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 272, DE 14 DE MARÇO DE 2019. Disponível em: https://www.in.gov.br/web/guest/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/67378977/do1-2019-03-18-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-272-de-14-de-marco-de-2019-67378770. Acesso em 03 de Junho de 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. Publicado no Diário Oficial da União de 05/04/2000, seção 1, p. 6, 2000. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-sda-4-de-31-03-2000,662.html>.

CAMARGO, K. C. et al. Antibacterial action of the essential oil from *Cantinoa carpinifolia* benth. Against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 35, n. 1, p. 99-106, 2020.

CANABADY-ROCHELLE, L.L. et al. SPR screening of metal chelating peptides in a hydrolysate for their antioxidant properties. **Food chemistry**. v. 15, p. 478-485, 2018.

CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (2021). Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/en/brazilian-agribusiness-news/brazilian-beef-export-price-and-the-revenue-from-international-sales-in-july-set-records.aspx>. Acesso em 03 de Junho de 2022.

CHANDRIKA, U. G.; KARUNARATHNA, U. Anesthetics and analgesic activities of herbal medicine: Review of the possible mechanism of action. **Features and Assessments of Pain, Anaesthesia, and Analgesia**, p. 47-56, 2022.

CHAUDHARI, A. K et al. Fabrication, characterization, and bioactivity assessment of chitosan nanoemulsion containing allspice essential oil to mitigate *Aspergillus flavus* contamination and aflatoxin B1 production in maize. **Food Chemistry**, v. 372, p. 131221, 2022.

CHEN, W.; YU, H. Q. Advances in the characterization and monitoring of natural organic matter using spectroscopic approaches. **Water research**, v. 190, p. 116759, Feb, 2021.

CHEN, J. et al. Insights into drug discovery from natural products through structural modification. **Fitoterapia**. v.1, n. 103, p. 231-241, Jun, 2015.

CICHOSKI, A. J. et al. Effects of ultrasonic-assisted cooking on the volatile compounds, oxidative stability, and sensory quality of mortadella. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 72, p. 105443, 2021.

CICHOSKI, A. J. et al. Ultrasound: A promising technology to improve the technological quality of meat emulsions. **Meat science**, v. 148, p. 150-155, 2019.

CUNHA, L. C. et al. Natural antioxidants in processing and storage stability of sheep and goat meat products. **Food research international**. v. 111, p. 379-390, 2018.

da SILVA, B. D et al. Essential oil nanoemulsions: Properties, development, and application in meat and meat products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 121, p. 1-13, Mar, 2022.

da SILVA, S. L. et al. Fat replacement by oleogel rich in oleic acid and its impact on the technological, nutritional, oxidative, and sensory properties of Bologna-type sausages. **Meat science**, v. 149, p. 141-148, 2019.

de CARVALHO, F. A. L. et al. Turmeric (*Curcuma longa* L.) extract on oxidative stability, physicochemical and sensory properties of fresh lamb sausage with fat replacement by tiger nut (*Cyperus esculentus* L.) oil. **Food Research International**, v. 136, p. 109487, 2020.

de ELGUEA-CULEBRAS, G. O.; BRAVO, E. M.; SÁNCHEZ-VIOQUE, R. Potential sources and methodologies for the recovery of phenolic compounds from distillation residues of Mediterranean aromatic plants. An approach to the valuation of by-products of the essential oil market—A review. **Industrial Crops and Products**, v. 175, p. 114261, 2022.

de OLIVEIRA, T. L. et al. Antioxidant effects of *Satureja montana* L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **LWT-Food Science and Technology**. v. 45, p. 204-212, 2012.

DJIKENG, F. T. et al. Effect of different processing methods on the proximate composition, mineral content and functional properties of snail (*Archachatina marginata*) meat. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 8, p. 100298, 2022.

DOMÍNGUEZ, R. et al. A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, p. 429, 2019.

DOMÍNGUEZ, R. et al. Active packaging films with natural antioxidants to be used in meat industry: A review. **Food research international**. v. 113, p. 93-101, 2018.

dos SANTOS, D. M. et al. Advances in 3D printed sensors for food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 154 p. 116672, Sep, 2022.

DUKIĆ, M. N. et al. The effect of plant secondary metabolites on lipid peroxidation and eicosanoid pathway. **Lipid Peroxidation**, p. 193-210, 2012.

- DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de Alimentos**. 3 ed. rev. e ampl. Curitiba: Champagnat, 2011. 426 p.
- EFSA. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on the public health risks related to mechanically separated meat (MSM) derived from poultry and swine. **EFSA Journal**. v. 11, n. 3, p. 3137, Mar, 2013.
- FERREIRA, V. R. F. et al. Colorimetric, electroanalytical and theoretical evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium aromaticum* L., *Origanum vulgare* L., *Mentha spicata* L. and *Eremanthus erythropappus* M. essential oils, and their major constituents. **New Journal of Chemistry**. v. 43, n. 20, p. 7653-7662, 2019.
- GAIN Report - Global Agricultural Information Network. Livestock and Products Semi-annual. Disponível em: https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Livestock%20and%20Products%20Semi-annual_Brasilia_Brazil_BR2022-0018.pdf. Acesso em 03 de Junho de 2022.
- GAIN Report - Global Agricultural Information Network. Poultry and Products Annual. https://usdabrazil.org.br/wp-content/uploads/2021/09/Poultry-and-Products-Annual_Brasilia_Brazil_09-01-2021-1.pdf. Acesso em 03 de Junho de 2022.
- GASSARA, F. ET al. Green alternatives to nitrates and nitrites in meat-based products—a review. **Critical reviews in food science and nutrition**. v. 56, p. 2133-2148, 2016.
- GAY, C. A.; GEBICKI, J. M. Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric–xylenol orange peroxide assay. **Analytical biochemistry**, v. 304, n. 1, p. 42-46, 2002.
- GHABRAIE, M. et al. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. **LWT-Food Science and Technology**. v. 66, p. 332-339, 2016.
- GHANI, M. A. et al. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food chemistry**. v. 230, p.195-207, Sep, 2017.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GUERRA, I. C. D. et al. Evaluation of goat mortadella prepared with different levels of fat and goat meat from discarded animals. **Small Ruminant Research**, v. 98, n. 1-3, p. 59-63, 2011.
- GUIMARÃES, A. S. et al. Characterization of natural curing agents from Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) for their use in clean label restructured cooked meat products. **LWT**, v. 150, p. 111970, 2021.
- GUIMARÃES, A. S. et al. Assessment of Japanese radish derivatives as nitrite substitute on the physicochemical properties, sensorial profile, and consumer acceptability of restructured cooked hams. **Meat Science**, v. 192, p. 108897, 2022.

GUNTERO, V. A. et al. Synthesis and encapsulation of bis-eugenol in a mesoporous solid material: Enhancement of the antioxidant activity of a natural compound from Clove Oil. **Chemical Science International Journal**, v. 22, n. 4, p. 1-10, 2018.

GUZMÁN, D. et al. Fully renewable thermosets based on bis-eugenol prepared by thiol-click chemistry. **Reactive and Functional Polymers**. v. 136, p. 153-166, Mar, 2019.

HOBANI, Y. H. et al. Gastroprotective effect of low dose Eugenol in experimental rats against ethanol induced toxicity: Involvement of antiinflammatory and antioxidant mechanism. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 289, p. 115055, 2022.

HORITA, C. N. et al. Physico-chemical and sensory properties of reduced-fat mortadella prepared with blends of calcium, magnesium and potassium chloride as partial substitutes for sodium chloride. **Meat science**, v. 89, n. 4, p. 426-433, 2011.

HUANG, Q. et al. Effect of eugenol fumigation treatment on chilling injury and CBF gene expression in eggplant fruit during cold storage. **Food chemistry**. v. 292, p. 143-150, Sep, 2019.

ISO - International Standard Organization. ISO 9235: **Aromatic Natural raw materials-vocabulary**. 2^a ed. 2013:14. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/51017.html>. Acesso em 06 de Junho de 2022.

JAFARIZADEH-MALMIRI, H. et al. Nano-additives for Food Industries. In **Nanobiotechnology in Food: Concepts, Applications and Perspectives**: Springer, Cham, p. 41-68, 2019.

JO, C.; AHN, D. U. Fluorometric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. **Poultry Science**, v. 77, n. 3, p. 475-480, 1998.

JOKANOVIĆ, M. et al. Essential oil and supercritical extracts of winter savory (*Satureja montana* L.) as antioxidants in precooked pork chops during chilled storage. **LWT**, v. 134, p. 110260, 2020.

KAUFMAN, T. S. The multiple faces of Eugenol. A versatile starting material and building block for organic and bio-organic synthesis and a convenient precursor toward bio-based fine chemicals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 26, n. 6, p. 1055-1085, Jun, 2015.

KEWSCIENCE. **Plants of the world online**. Disponível em: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:601421-1#image-gallery>. Acesso em 19 de Maio de 2022.

KHARE, A. K.; BISWAS, A. K.; SAHOO, J. Comparison study of chitosan, EDTA, eugenol and peppermint oil for antioxidant and antimicrobial potentials in chicken noodles and their effect on colour and oxidative stability at ambient temperature storage. **LWT-Food Science and Technology**. v. 55, n. 1, p. 286-293, Jan, 2014.

- KIM, J. H., et al. Reduction of volatile compounds and off-odor in irradiated ground pork using a charcoal packaging. **Journal of muscle foods**. v. 19, n. 2, p. 194-208. 2008.
- KIM, T. K. et al. Effects of replacing pork fat with grape seed oil and gelatine/alginate for meat emulsions. **Meat Science**, v. 163, p. 108079, 2020.
- KIM, T. K. et al. Impacts of fat types and myofibrillar protein on the rheological properties and thermal stability of meat emulsion systems. **Food Chemistry**, v. 346, p. 128930, 2021.
- KOEDUKA, T. et al. Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.103, n. 26, p. 10128-10133, Jun, 2006.
- KRUSE, N. D.; TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores da EPSPS: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**. v. 1, n. 2, p.139-146, Aug, 2000.
- LAMBERT, J. B. et al. **Organic structural spectroscopy**. 1 ed. Prentice-Hall: New Jersey, 568 p., 1998.
- LEÃES, Y. S. V. et al. Combined effect of ultrasound and basic electrolyzed water on the microbiological and oxidative profile of low-sodium mortadellas. *International Journal of Food Microbiology*, v. 353, p. 109310, 2021.
- LEE, J. et al. Improved physicochemical properties of pork patty supplemented with oil-in-water nanoemulsion. **Food Science of Animal Resources**, v. 40, n. 2, p. 262, 2020.
- LEITE, R. Tudo o que é preciso saber sobre a análise de alimentos- Introdução, 2019. Disponível em: foodsafetybrazil.org/serie-tudo-o-que-eu-preciso-saber-sobre-analise-de-alimentos-1/?cn-reloaded=1. Acessado em 06 de Junho de 2022.
- LEMES, J. S.; GIULIANI, C. S.; BESERRA, A. S. Testes afetivos in: **NORA, F. M. D. Análise Sensorial Clássica: fundamentos e métodos**. Canoas : Mérida Publishers, 2021. 139p.
- LI, C. et al. Synthesis and oxidative stability of hyperbranched macromolecule-bridged hindered phenols. **New Journal of Chemistry**. v. 41, n. 14, p. 6395-6404, 2017.
- LI, H. et al., Eugenol alleviated nonalcoholic fatty liver disease in rat via a gut-brain-liver axis involving glucagon-like Peptide-1. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 725, p. 109269, 2022.
- LU, J. et al. A comprehensive review of advanced glycosylation end products and N-Nitrosamines in thermally processed meat products. *Food Control*, v. 131, p. 108449, 2022.
- MA, W. et al. The acaricidal activity and mechanism of eugenol on *Psoroptes cuniculi*. **Veterinary parasitology**. v. 266, p. 56-62, Feb, 2019.
- MACCIONI, A. et al. Antifungal activity and chemical composition of the essential oil from the aerial parts of two new *Teucrium capitatum* L. chemotypes from Sardinia Island, Italy. **Natural Product Research**, v. 35, n. 24, p. 6007-6013, 2021.

MACHADO, J. R. et al. Synthesis of eugenyl acetate by immobilized lipase in a packed bed reactor and evaluation of its larvicidal activity. **Process Biochemistry**. v. 58, p. 114-119, Jul, 2017.

MAJEED, H. et al. Influence of carrier oil type, particle size on in vitro lipid digestion and eugenol release in emulsion and nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**. v.52, p. 415-422, Jan, 2016.

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). DECRETO N° 10.468, de 18 de agosto de 2020 que dispõe sobre o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2020/10/RIISPOA-ALTERADO-E-ATUALIZADO-2020.pdf>. Acesso em 20 de novembro de 2022.

MASSINGUE, A. A. et al. Effect of mechanically deboned poultry meat content on technological properties and sensory characteristics of lamb and mutton sausages. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 31, n. 4, p. 576-584, Apr, 2018.

MATHAIYAN, M. et al. The free radicals scavenging potential of methanol extract of seeds (Horse gram) of *Macrotyloma uniflorum*. **Materials Today: Proceedings**, Mar, 2021.

MICHIELS, J. et al. In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 88, n. 13, p. 2371-2381, Oct 2008.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial: estudos com consumidores**. Viçosa: Editora UFV, 2013.

MINNELLI, C. et al. Synthesis, Characterization and Antioxidant Properties of a New Lipophilic Derivative of Edaravone. **Antioxidants**. v. 8, n. 8, p. 258-272, Aug, 2019.

MODZELEWSKA-KAPITUŁA, M.; ŻMIJEWSKI, T. The influence of muscle type and the post-mortem ageing on the colour of fallow deer meat. **Small Ruminant Research**, v. 212, p. 106707, 2022.

MOHAMED, H. M.; MANSOUR, H. A. Incorporating essential oils of marjoram and rosemary in the formulation of beef patties manufactured with mechanically deboned poultry meat to improve the lipid stability and sensory attributes. **LWT-Food Science and Technology**. v. 45, n. 1, p. 79-87, Jan, 2012.

MOHAMMADZADEH-AGHDASH, H. et al. Molecular and Technical Aspects on the Interaction of Serum Albumin with Multifunctional Food Preservatives. **Food Chemistry**, v. 293, p. 491-498, 2019.

MOHAMMED, H. H. H. et al. Comparative characterization of proximate nutritional compositions, microbial quality and safety of camel meat in relation to mutton, beef, and chicken. **LWT**, v. 118, p. 108714, 2020.

MONTANARI, C. et al. Effects of the diameter on physico-chemical, microbiological and volatile profile in dry fermented sausages produced with two different starter cultures. **Food bioscience**, v. 22, p. 9-18, 2018.

MONTESCHIO, J. O. et al. Clove and rosemary essential oils and encapsuled active principles (eugenol, thymol and vanillin blend) on meat quality of feedlot-finished heifers. **Meat science**. v.1, n. 130, p. 50-57, Aug, 2017.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, Jan. 2009.

MÓRI, C. et al. Carne de aves separada mecanicamente (mechanical separated poultry meat). **REDVET**. v. 7, n. 4, Abr, 2006.

MUHLEMANN, J. K. et al. The monolignol pathway contributes to the biosynthesis of volatile phenylpropenes in flowers. **New Phytologist**. v. 204, n. 3, p. 661-670, Nov, 2014.

MURAKAMI, Y. et al. Preventive effect of bis-eugenol, a eugenol ortho dimer, on lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa B activation and inflammatory cytokine expression in macrophages. **Biochemical pharmacology**. v. 66, n. 6, p. 1061-1066, Sep, 2003.

MUSTHAFA, K. S. et al. Antifungal potential of eugenyl acetate against clinical isolates of *Candida* species. **Microbial pathogenesis**. v. 99, p. 19-29, Oct, 2016.

NAKANO, T.; OZIMEK, L.; BETTI, M. Immunological detection of keratan sulfate in meat products with and without mechanically separated chicken meat. **Meat science**. v. 92, n. 4, p. 867-869, Dec, 2012.

NAVIKAITE-SNIPAITIENE, V. et al. Development of antioxidant food packaging materials containing eugenol for extending display life of fresh beef. **Meat science**. v. 145, p. 9-15, 2018.

NIKLAS, A. A. et al. The occurrence of volatile and non-volatile N-nitrosamines in cured meat products from the Danish market. *Food Chemistry*, v. 378, p. 132046, 2022.

NISAR, M. F. et al. Pharmacological properties and health benefits of eugenol: a comprehensive review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

NOVATO, T. L. P. et al. Evaluation of synergism and development of a formulation with thymol, carvacrol and eugenol for *Rhipicephalus microplus* control. **Experimental Parasitology**. v. 207, p. 107774, oct, 2019.

OGATA, M. et al. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 48, n. 10, p. 1467-1469, Oct, 2000.

OLSZOWY M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 144, p. 135-143, Sep, 2019.

- ONGARATTO, G. C. et al. Cochineal carmine adsorbed on layered zinc hydroxide salt applied on mortadella to improve color stability. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 758-764, 2021.
- PATEIRO, M. et al. Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. **Food Research International**. v. 113, p. 156-166, 2018.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIS, G. S. **Introduction to Spectroscopy**. 2 Ed. Saunders Golden Sunburst Series: Orlando, 680 p., 1996.
- PAVITHRA, P. S.; MEHTA, A.; VERMA, R. S. Essential oils: from prevention to treatment of skin cancer. **Drug discovery today**. v. 24, p. 644-655, 2019.
- PIKUL, J.; LESZCZYNSKI, D. E.; KUMMEROW, F. A. Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 1309-1313, 1989.
- PINELLI, J. J. et al. Essential oil nanoemulsions for the control of *Clostridium sporogenes* in cooked meat product: An alternative?. **LWT**, v. 143, p. 111123, 2021.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.
- PURRIÑOS, L. et al. Descriptive sensory analysis as an analytical tool for the sensory characterization of meat products: Fundamentals, panel training, and descriptors of meat products. In: **Sensory Analysis for the Development of Meat Products**. Woodhead Publishing, 2022. p. 51-76.
- RAHARJO, S.; SOFOS, J. N.; SCHMIDT, G. R. Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C18 method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 11, p. 2182-2185, 1992.
- RANUCCI, D. et al. Dietary essential oil mix improves oxidative stability and hygienic characteristic of lamb meat. **Small Ruminant Research**. v. 1, n. 175, p. 104-109, Jun, 2019.
- REIS, S. et al. Use of liposomes to evaluate the role of membrane interactions on antioxidant activity. **InLiposomes**: Humana Press, p. 167-188, 2010.
- REQUENA, R.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Eugenol and carvacrol migration from PHBV films and antibacterial action in different food matrices. **Food chemistry**. v. 277, p. 38-45, Mar, 2019.
- RESENDE, D. B. et al. Synthesis and in vitro evaluation of peracetyl and deacetyl glycosides of eugenol, isoeugenol and dihydroeugenol acting against food-contaminating bacteria. **Food chemistry**. v. 237, p. 1025-1029, Dec, 2017.
- RIBEIRO, J. S. et al. Natural antioxidants used in meat products: A brief review. **Meat science**. v. 148, p. 181-188, 2019.

RUTKOWSKA, M. et al. Seasonal variation in phenylpropanoid biosynthesis and in vitro antioxidant activity of *Sorbus domestica* leaves: Harvesting time optimisation for medicinal application. **Industrial Crops and Products**, v. 156, p. 112858, 2020.

SADEER, B. N. et al. The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 709, 2020.

SAHIN, S. et al. Identification of eugenol as the major determinant of GABAA-receptor activation by aqueous *Syzygium aromaticum* L. (clove buds) extract. **Journal of functional foods**. v. 37, p. 641-649, 2017.

SALDAÑA, E. et al. Use of sensory science for the development of healthier processed meat products: A critical opinion. **Current Opinion in Food Science**, v. 40, p. 13-19, 2021.

SAMADI, N. et al. Biopreservation of hamburgers by essential oil of *Zataria multiflora*. **Natural product research**. v. 26, p. 665-668, 2012.

SANTIAGO, J. A. et al. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L.: secretory structures, antibacterial and antioxidant activities. **Acta Scientiarum. Biological Science**, Maringá, v. 38, n. 2, p. 139-147, Apr.-June., 2016.

SARICAOGLU, F. T.; TURHAN, S. Performance of mechanically deboned chicken meat protein coatings containing thyme or clove essential oil for storage quality improvement of beef sucuks. **Meat science**. v. 1, n. 158, p. 107912, Dec, 2019.

SATO, M. et al. A Highly Selective, High-Speed, and Hydrolysis-Free O-Acylation in Subcritical Water in the Absence of a Catalyst. **Angewandte Chemie International Edition**. v. 46, n. 33, p. 6284-6288, Aug, 2007.

SCHRANZ, M. et al. Influence of the chemical structure on the odor qualities and odor thresholds of guaiacol-derived odorants, Part 1: Alkylated, alkenylated and methoxylated derivatives. **Food Chemistry**. v. 232, p. 808-819, 2017.

SELL, A. B.; CARLINI, E. A. Anesthetic action of methyleugenol and other eugenol derivatives. **Pharmacology**. v. 14, n. 4, p. 367-377, 1976.

SERINER, R. et al. Examination of the effect of curcumin in experimental liver damage created by diethylnitrosamine in Swiss albino mice to superoxide dismutase and catalase activities and glutathione, malondialdehyde, and advanced oxidation protein products levels. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 3, p. 1217-1225, 2022.

SILVA, M. F. G. et al. Yacon syrup: Food applications and impact on satiety in healthy volunteers. *Food Research International*, v. 100, p. 460-467, 2017.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSELER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 387 p., 1991.

SIMÕES, C. M. O et al., **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 2007:1104 p.

SOBRINHO, A. C. N. et al. Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. (Asteraceae). **Industrial Crops and Products**. v. 84, p. 108-115, 2016.

SOGLIA, F.; PETRACCI, M.; ERTBJERG, P. Novel DNPH-based method for determination of protein carbonylation in muscle and meat. **Food chemistry**, v. 197, p. 670-675, 2016.

SPARKS, T. C. Insecticide discovery: an evaluation and analysis. **Pesticide biochemistry and physiology**. v. 107, n. 1, p. 8-17, Sep, 2013.

SPEIGHT, K. C. et al. Consumer insights on prepackaged Cheddar cheese shreds using focus groups, conjoint analysis, and qualitative multivariate analysis. *Journal of dairy science*, v. 102, n. 8, p. 6971-6986, 2019.

STONE, H., BLEIBAUM, R., & THOMAS, H. A. **Sensory evaluation practices**. Academic press, 2020.

TAKSHAK, S.; AGRAWAL, S.B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 193, p. 51-88, Apr, 2019.

TALÓN, E. et al. Antioxidant starch-based films with encapsulated eugenol. Application to sunflower oil preservation. **LWT**, v. 113, p. 108290, 2019 b.

TALÓN, E. et al. Encapsulation of eugenol by spray-drying using whey protein isolate or lecithin: Release kinetics, antioxidant and antimicrobial properties. **Food chemistry**. v. 295, p.588-598, Oct, 2019 a.

TEIXEIRA, M. L. et al. *Citrumelo Swingle*: Caracterização Química, Atividade Antioxidante e Antifúngica dos Óleos Essenciais das Cascas Frescas e Secas. **Magistra**, v. 24, n. 3, p. 194-203, jul./set. 2012.

TEIXEIRA, R. R. et al., Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1, 2, 3-triazole functionalities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 146, p. 274-286, 2018.

THAKUR, M., et al. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**. v.12, p. 1-12, March, 2019.

TOMASEVIC, I. et al. Recent advances in meat color research. **Current Opinion in Food Science**, v. 41, p. 81-87, 2021.

TORIBIO, L. et al. Supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry: A valuable tool in food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 143, p. 116350, 2021.

- TRINDADE, M. A. et al., Estabilidade oxidativa e microbiológica em carne de galinha mecanicamente separada e adicionada de antioxidantes durante período de armazenamento a-18 °C. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 28, n. 1, p. 160-168, 2008.
- TRINDADE, M. A.; CONTRERAS, C. C.; FELÍCIO, P. E. Mortadella sausage formulations with partial and total replacement of beef and pork backfat with mechanically separated meat from spent layer hens. *Journal of food science*. v. 70, n. 3, p. S236-241, Apr, 2006.
- VANDGHANOONI, S. et al. Cytotoxicity and DNA fragmentation properties of butylated hydroxyanisole. *DNA and cell biology*. v. 3, p. 98-103, 2013.
- VASCONCELOS, A. N. et al. Dimer fatty acid and fatty amide effects on the properties of synthetic-based drilling fluids. *Journal of Molecular Liquids*, v. 359, p. 119270, 2022.
- WANG, K. et al. Identification and quantification of synergetic antioxidants and their application in sunflower oil. *LWT. INSS*, v. 118, p. 108726, 2020 a.
- WANG, X. et al. Design and synthesis of novel pyrethroids containing eugenol moiety. *Medicinal Chemistry Research*, v. 21, n. 10, p. 2827-2830, 2012.
- WANG, X. et al. Janus-Faced Fluorescence Imaging Agent for Malondialdehyde and Formaldehyde in Brains. *Analytical Chemistry*, v. 94, n. 43, p. 14965-14973, 2022.
- WANG, Y. F. et al. Antifungal effects of clove oil microcapsule on meat products. *LWT*. v. 89, p. 604-609, 2018.
- WANG, Z. et al. Using oxidation kinetic models to predict the quality indices of rabbit meat under different storage temperatures. *Meat science*, v. 162, p. 108042, 2020b.
- WONG, D. W. S. Additives. In: **Mechanism and Theory in Food Chemistry**. Second Edition. Springer, Cham. p. 361-380, 2018.
- WUBSHET, S. G. et al. NK. Raman spectroscopy for quantification of residual calcium and total ash in mechanically deboned chicken meat. *Food control*. v. 95, p. 267-273, Jan, 2019.
- YAHYAA, M. et al. Biosynthesis of methyleugenol and methylisoeugenol in *Daucus carota* leaves: Characterization of eugenol/isoegenol synthase and O-Methyltransferase. *Phytochemistry*. v. 159, p. 179-189, Mar, 2019.
- YAUK, Y. K. et al. Alcohol acyl transferase 1 links two distinct volatile pathways that produce esters and phenylpropenes in apple fruit. *The Plant Journal*. v. 91, n. 2, p. 292-305, Jul, 2017.
- YILDIZ, G. et al. Electrochemical oxidation mechanism of eugenol on graphene modified carbon paste electrode and its analytical application to pharmaceutical analysis. *Talanta*, v. 173, p. 1-8, May., 2017.
- ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020.

ZHANG, H.; WU, J.; GUO, X. Effects of antimicrobial and antioxidant activities of spice extracts on raw chicken meat quality. **Food Science and Human Wellness**. v. 5, n. 1, p. 39-48, Mar, 2016.

ZHENG, K. et al. Chitosan-acorn starch-eugenol edible film: Physico-chemical, barrier, antimicrobial, antioxidant and structural properties. **International journal of biological macromolecules**. v. 135, p. 344-352, Aug, 2019.

ZOU, Q. et al. Combined metabolomic and transcriptomic analysis reveals redirection of the phenylpropanoid metabolic flux in different colored medicinal *Chrysanthemum morifolium*. **Industrial Crops and Products**, v. 164, p. 113343, 2021.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

Artigo I – Estudo Preliminar

Artigo submetido ao Conselho Editorial do periódico “ACS Food Science and Technology” e formatado conforme normas do referido periódico.

ARTIGO I – ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AND THEIR PRINCIPAL COMPONENTS: SPECTROPHOTOMETRIC, VOLTAMMETRIC AND THEORETICAL INVESTIGATION OF THE CHELATING EFFECT OF EUGENOL AND CARVACROL

Vanuzia Rodrigues Fernandes Ferreira^a, Isabela Aparecida Militani^a, Katia Julia de Almeida^a, Allan da Silva Lunguinho^a, Adelir Aparecida Saczk^a, Marisa Ionta^b, Guilherme Álvaro Ferreira da Silva^b, Fabiana Silva Felix^a, David Lee Nelson^c and Maria das Graças Cardoso^{*a}

^a*Chemistry Department, Federal University of Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brazil;*

^b*Department of Cell Biology, Federal University of Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil;*

^c*Postgraduate Program in Biofuels, Federal University of The Jequitinhonha and Mucuri Valleys, 39100-900, Diamantina-MG, Brazil.*

*** Corresponding author:** mcardoso@ufla.br

Cx. Postal 3037, 37.200.000 – Lavras-MG

Phone: +55 35 3829-1202 Fax: +55 35 3829-1271

Abstract

The antioxidant and chelating properties of the essential oils of *Syzygium aromaticum* L. and *Origanum vulgare* L. and their principal eugenol and carvacrol constituents were evaluated by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay and in the presence of iron(II) ions by cyclic voltammetry. In the TBARS assay, carvacrol (IC_{50} $35.07 \pm 5.87 \mu\text{g mL}^{-1}$) and eugenol (IC_{50} $164.45 \pm 11.10 \mu\text{g mL}^{-1}$) inhibited the formation of secondary lipid peroxidation compounds more efficiently than the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT). The anodic current of the iron(II) solution was reduced by 99.7% for *S. aromaticum*, 99.8% for eugenol, whereas the values of 89.3% and 99.4% were observed for *O. vulgare* and carvacrol, respectively. The UV spectra contained a band at 390 nm for the interaction between Fe(II):ligands and a band with λ_{max} at 650 nm, better defined for the Fe(II):eugenol complex. The formation of the iron(II) chelate complex is thermodynamically stable with three eugenol molecules, whereas only two carvacrol ligands were monocoordinated to the central iron(II) ion. Low cytotoxicity against fibroblast cells (CCD-1059Sk) was observed for the essential oils, as well as for eugenol and carvacrol. The essential oils and their principal constituents (eugenol and carvacrol) can be used in food preservation because their cytotoxicities are low, and they are antioxidants with a chelating effect on metal ions.

Keywords: *Syzygium aromaticum* L. *Origanum vulgare* L. cell viability. cyclic voltammetry. lipid peroxidation.

1. Introduction

Food deterioration is an economic, environmental and public health problem, and it is a major concern of the food industry. Microorganism contamination and some pathogenic fungus species are mainly responsible for this type of food spoilage.¹ Oxidation is another important cause of degradation of biological materials and foods. The formation of free radicals takes place in this process, which leads to deleterious effects on foods.^{2,3} Particularly, the Fe(II) to Fe(III) oxidation leads to the generation of reactive oxygen species (ROS) such as the hydroxyl radical (OH•), which catalyzes lipid peroxidation in biosystems.⁴ An alternative to control food spoilage is the use of additives such as preservatives and antioxidants that are capable of delaying and inhibiting the action of free radicals so as to protect lipid and protein substrates.⁵ Among these additives, the synthetic antioxidants butyl hydroxyanisole (BHA), 2,6-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene (BHT), tert-butylhydroquinone (TBHQ) and propyl gallate (PG) are widely used in the food industry.⁶⁻⁹ Nonetheless, different toxicity levels and carcinogenic effects have been ascribed to these substances, so there is a growing interest in substituting them with natural additives.¹⁰⁻¹⁵

Among natural substances, essential oils play an important role as antimicrobial and antioxidant agents in food deterioration.^{13,16-18} Essential oils obtained from *Syzygium aromaticum* L. and *Origanum vulgare* L. species have been widely used in food technology because of their large contents of phenylpropanoid and aromatic monoterpene species, which have effective biological antimicrobial and antioxidant activities.^{19,20} Several of these constituents can act as complexing agents, stabilizing the free transition metal ions and preventing the oxidation processes by Fenton reactions.^{10,11,21-23} Some information can be found in literature regarding chemical reaction mechanisms that involve the chelating activity of essential oils in food.

From an experimental point of view, Ogiwara et al.²⁴ have investigated the influence of iron chelating active packaging on the effectiveness of hydroxamate chelators. Sheikh et al.²² have evaluated the iron chelating and antioxidant potentials of *Epilobium hirsutum* for the management of iron overload disease. Canabady-Rochelle et al.⁴ have studied the chelating activity of copper(II) ions with some peptides in a hydrolysate for their antioxidant properties.

Theoretical investigations using quantum chemistry methodologies can provide reliable atomic and molecular information about the chemical mechanisms of molecular systems with biological, pharmaceutical and industrial applications.²⁵⁻²⁹ To the best of our knowledge, no computational investigation can be found in the literature regarding the essential oils and their iron chelating process. This kind of study can be very useful because the analysis of the experimental characterization and spectroscopic data can be, in many cases, a rather complex task so that these studies can help to better understand the experimental findings.³⁰⁻³³

Several theoretical studies have already been performed regarding the chemical issues in foods and their processes.³⁴⁻³⁸ Serobatse and Kabanda³⁹ have performed a theoretical study on the antioxidant properties of two chalcone derivatives, that is, kanakugiol and pedicellin, toward the ability to coordinate with Fe(II) and Fe(III). Medine et al.⁴⁰ have experimentally and theoretically studied the structures and antimutagenic effects of vanadium with chelating flavonoids. Finally, de Oliveira et al.⁴¹ have studied the stabilization of the different sulfur-containing copper compounds to improve the sensorial characteristics of cachaça.

The objective of the present work was to evaluate the antioxidant activities of essential oils from *S. aromaticum* and *O. vulgare* and their principal components, eugenol and carvacrol, based on their chelation activities and the protection of lipid substrates. These

properties were investigated by the use of the TBARS assay, electrochemical analysis and UV–vis spectroscopy. In addition, a computational analysis based on the Density Functional Theory method was performed to provide information regarding the reaction mechanisms involving the interactions of carvacrol and eugenol with the Fe(II) and Fe(III) ions. Finally, a cell viability assay using the CCD-1059Sk cell line (fibroblasts derived from normal skin) was performed to compare the effect of synthetic antioxidants BHT and ascorbic acid in the evaluation of the safe dose necessary to ensure food healthiness for future applications.

2. Experimental

2.1. Chemicals and Reagents

Chemicals and solvents, namely hexane (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), eugenol (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany), carvacrol (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA – Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), anhydrous sodium sulfate (Quimex, Cotia, São Paulo, Brazil), ferrous sulphate (êxodo científica, Hortolândia, SP, Brazil), hydrogen peroxide (Audaz, São Paulo, Brazil), glacial acetic acid (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), thiobarbituric acid (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany) were reagent grade. Aqueous solutions were prepared using deionized water.

2.2. Characterization of the essential oils from *S. aromaticum* and *O. vulgare* species

Floral buds of *S. aromaticum* and fresh leaves of *O. vulgare* were used to obtain the respective essential oils by hydrodistillation. After extraction, hexane solutions of the constituents present in the essential oils were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometer (GC-MS). Their quantification was performed by area normalization, using

gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID) as previously described elsewhere.⁴²

2.3. Thiobarbituric acid reactive substances Assay

The capacity to inhibit lipid peroxidation, that is, the formation of malonaldehyde, was determined by the TBARS assay using the method described by Bounatirou et al.⁴³ A 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aliquot of a 10% (w/v) egg yolk emulsion in KCl (1.15 %) was incubated with 100 μL of samples (eugenol, carvacrol and essential oils diluted in ethanol in concentrations of 32.5 at 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), and 100 μL of a FeSO_4 (0.25 mM)/EDTA (0.32 mM) and 100 μL H_2O_2 (0.017 M) for 30 minutes at 50 °C. In sequence, 1.5 mL of acetic acid (20%) and 1.5 mL of thiobarbituric acid (0.8% in SDS 1.1%) were added to the mixture, followed by further incubation at 95 °C for 60 minutes, cooling to room temperature. Four mL of butanol were then added, stirred and centrifuged for 5 minutes at 3000 g. The absorbance (Abs) was measured on a UV/VIS spectrophotometer (Shimadzu UV-160 1 PC) at 532 nm. The samples were replaced by ethanol in the negative control. The antioxidant BHT was used as a positive control, and the whole assay was performed in triplicate. The percentage of antioxidant activity was measured using the equation: $\%AA = 1 - [(Abs_{\text{sample}} \div Abs_{\text{control}}) \times 100]$. The IC_{50} was determined from the equation for the concentration versus %AA curve.

2. 4. Electroanalytical Analysis

The methodology adapted from Gonçalves et al.¹⁰ and Vega-Hernández et al.⁴⁴ was used to perform the voltammetric assays based on the electrooxidation of iron(II) to iron(III) ions to evaluate the antioxidant and chelator capacity of the essential oils obtained from *S. aromaticum* and *O. vulgare* species and their principal constituents eugenol and carvacrol, respectively. Electrochemical measurements were performed with a potentiostat/galvanostat

instrument connected to a three-electrode cell, Ivium Technologies (Vertex) linked to a computer (IviumSoft, version 1.1+ software). A conventional cell of 15 mL was used for all experiments. A vitreous carbon electrode was used as the working electrodes, platinum wire used as an auxiliary electrode, and Ag/AgCl (sat. KCl) electrode as a reference electrode. The vitreous carbon electrode was polished on alumina and washed with distilled water, before and after each evaluation.

The aqueous solution of sodium sulfate 0.05 mol L^{-1} was used as support electrolyte and negative control. The potential window ranging from 0.0 V to +1.2 V (versus Ag/AgCl_{KCl(sat)}) and the analytical signal (Ips) was recorded with a scan rate of 50 mVs^{-1} . The same conditions were used to record the analytical signal of electrooxidation of iron (II) to iron (III) ions, by the addition of 5 mL of FeSO₄·5H₂O ($139 \mu\text{g mL}^{-1}$) in 10 mL of support electrolyte. The samples were added at increasing concentrations (2.5 to $500 \mu\text{g mL}^{-1}$) to the electrochemical cell containing FeSO₄·5H₂O ($139 \mu\text{g mL}^{-1}$) to evaluation the antioxidant and chelating capacity of essential oils and synthetic standards. The increasing EDTA addition (2.5 to $500 \mu\text{g mL}^{-1}$) to the electrochemical cell containing FeSO₄·5H₂O ($139 \mu\text{g mL}^{-1}$) was used as the positive control. The chelating potential was determined by decreasing the anodic current in the electro-oxidation region of iron (II) ions using the IviumSoft software (version 1.1+ software).

2.5. UV–vis spectroscopy

The formation of a complex of eugenol and carvacrol with iron(II) ions in solution was confirmed by scanning the spectrum in a wavelength range from 200 to 1100 nm on a UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu UV-160 1 PC). Stock solutions of 0.024 mol L^{-1} of FeCl₂, eugenol and carvacrol were prepared in ethanol, and the spectra were obtained for the individual solutions and for the mixtures of iron(II):ligand in ratios of 1:1 to 1:6 for the

complexes formed: iron(II):eugenol (FeEU) and iron(II):carvacrol (FeCar). Ethanol was used as a blank.

2. 6. Computational Details

The density functional calculations were performed using the hybrid B3LYP functional.⁴⁵ The GDIIS algorithm was employed in combination with the very tight SCF restriction and ultrafine integration grid. The CBSB7 atomic basis set of Montgomery and co-workers, which is well-known for computing fully accurate energies of the organic and inorganic compounds, was used for all the atoms.⁴⁶ No symmetry restriction has been imposed during geometry optimizations, and the standard convergence criteria were initially employed in all the calculations. The harmonic frequency (Hessian) calculations were performed after each completed optimization process to identify the molecular structures as being a minimal or a transition state. No negative frequencies were obtained for all stabilized complexes.

The theoretical models were built considering the direct interactions between Iron(II) and Iron(III) ions with different numbers of the carvacrol and eugenol ligands. The molecular models can be represented by the following expression



where L is the investigated ligands, n is the final charge of the complex formed, which depends on the oxidation state of the metal center and charge of ligand. x represents the number of ligands, which varied from one to six in both cases. The electronic bonding energies of the optimized coordinated iron complexes, named herein as ΔEBond , were obtained in the gas and solution phase, through the following expression:

$$\Delta\text{EBond} = \{E([\text{FeLx}]_{\text{n}+}) - (E(L) + E([\text{FeLx}-1]_{\text{n}+}))\} \quad (2)$$

The zero-point energy corrections were calculated using the harmonic approximation at the B3LYP/CBSB7 level of theory. The solvent model was described by the standard

polarizable continuum model (PCM), where a cavity was generated using the united-atom topological model.⁴⁷ All these calculations were performed in the Gaussian 09 program.⁴⁸

2. 7. Cytotoxicity Evaluation

The CCD-1059Sk cell line (fibroblasts derived from normal skin), purchased from a Rio de Janeiro cell bank, were used in this study for assessing cytotoxic profiles of the essential oils (EOs) from *S. aromaticum* and *O. vulgare*. The cytotoxicities of the eugenol, carvacrol, ascorbic acid (AAS) and butylated hydroxytoluene (BHT) were also evaluated.

The cell cultures were maintained in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Vitrocell, Campinas, Brazil). Cells were grown in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37 °C.

Cell viability was assessed by MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio] using CellTiter 96® AQueous One Promega, USA.⁴⁹ The cells were seeded into 96 well plates at a density of 1 x 10⁴ cells/well. After attachment (24 h), the cells were treated for 48 h with different samples in a concentration range 50-500 µg mL⁻¹. The analysis was performed in an ELISA microplate reader (Biochrom® Anthos Zenyth 200) at 490 nm. Experiments were conducted in triplicate, and the dose response curves are presented. The IC₅₀ value was determined from non-linear regression using GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

2. 8. Statistical analysis

The TBARS analysis and cytotoxicity evaluation were based on a completely randomized design, and the mean values of IC₅₀ were compared through the Scott–Knott test (Sisvar program)⁵⁰ and Tukey's post-test (Prism 5.00, GraphPad Software, Inc) at 5% of probability, respectively.

Security comments

No unexpected or unusually high safety hazards were encountered

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Identification and Quantification of Essential oils

The presence of eugenol and carvacrol were promptly identified in the essential oils under investigation, as is shown in the GC-MS chromatograms of Figure 1 and in Table 1, which presents the identification and quantification by area normalization of all the constituents present in the essential oils.

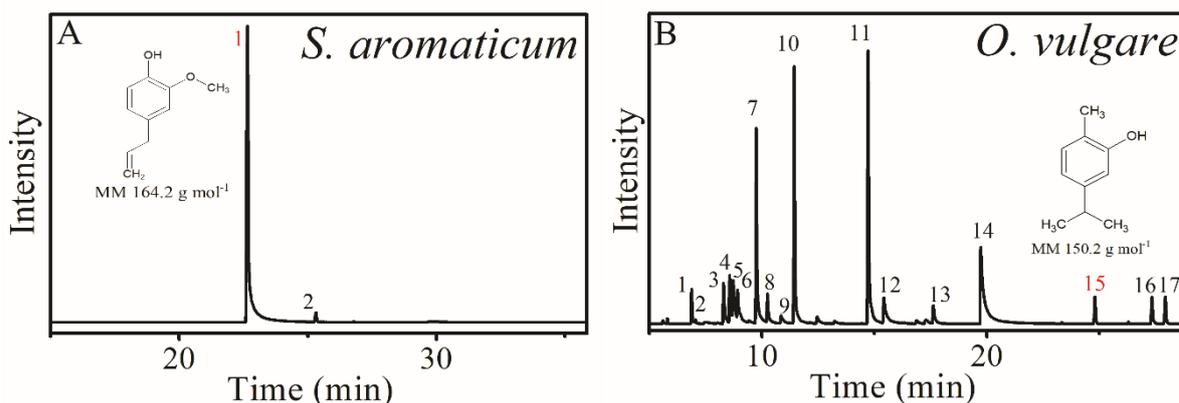


Figure 1. Gas chromatogram from the CG-MS: **A** - *S. aromaticum* essential oil. Identification of peaks: ¹Eugenol, and ²(E) β -ocimeno. **B** - *O. vulgare* essential oil. Identification of peaks: ¹Sabinene, ² β -Pinene, ³ α -Terpinene, ⁴*p*-Cimene, ⁵Limonene, ⁶(E) β -Ocimene, ⁷ γ -Terpinene, ⁸*Cis*-Sabinene hydrate, ⁹Terpinolene, ¹⁰*trans*-Sabinene hydrate, ¹¹Linalyl formate, ¹²Terpinen-4-ol, ¹³ α -Terpineol, ¹⁴Linalyl acetate, ¹⁵Carvacrol, ¹⁶ γ -Cadinene, ¹⁷Biciclogermacrene.

As can be seen, the essential oil from *S. aromaticum* is composed mostly of eugenol (96.3%) (Table 1), whereas a greater variability of constituents is observed in the essential oil obtained from *O. vulgare* (Table 1), in which the main constituents were terpinen-4-ol (22.9 %), *trans*-sabinene hydrate (20.6 %) and carvacrol (15.6 %).⁴² The retention times of these species are 14.71, 11.43, 19.73 s, respectively. These results are in good agreement with the previously reported findings.⁵¹⁻⁵²

Table 1. Percent of chemical constituents found in the essential oils from *S. aromaticum* and *O. vulgare*.

RI _{cal}	RI _{tab}	Constituents	% by area	
			<i>S. aromaticum</i>	<i>O. vulgare</i>
1356	1356	Eugenol	96.33	-
1455	1044	(<i>E</i>)- β -Ocimene	1.87	2.34
973	969	Sabinene	-	2.17
979	974	β -Pinene	-	0.39
1018	1014	α -Terpinene	-	2.78
1026	1020	<i>p</i> -Cymene	-	4.07
1030	1024	Limonene	-	1.61
1058	1054	γ -Terpinene	-	10.58
1072	1065	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	-	2.12
1088	1089	Terpinolene	-	0.82
1104	1098	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	-	20.56
1128	1214	Linalyl formate	-	0.85
1182	1174	Terpinen-4-ol	-	22.94
1199	1186	α -Terpineol	-	3.11
1250	1254	Linalyl acetate	-	2.44
1299	1298	Carvacrol	-	15.64
1481	1513	γ -Cadinene	-	2.22
1495	1500	Bicyclgermacrene	-	3.01
Total			98,12	97,65

RI_{cal} – Calculated retention index; RI_{tab} – Reference retention index.

3.2 TBARS assay

The TBARS assay evaluates the protection of lipid substrates by antioxidant species and provides an idea of the antioxidant potential of different molecules in food matrices. This protection can occur preventively or directly by complexing metal ions or by donating electrons or hydrogen atoms, respectively. All the samples exhibited an exponential antioxidant behavior with a dose-dependent effect (Figure S1 - supplementary material) by the TBARS assay. The highest antioxidant activity was observed for carvacrol ($35.07 \pm 5.87 \mu\text{g mL}^{-1}$) and eugenol ($164.45 \pm 11.10 \mu\text{g mL}^{-1}$), followed by BHT and the essential oil from *S. aromaticum* (IC₅₀ values of 394.00 ± 32.66 and $437.49 \pm 30.99 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively). A low antioxidant activity (IC₅₀ > $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$) was observed for the essential oil from *O. vulgare*. The results

are consistent with the chemical composition, which indicates a predominance of oxygenated monoterpenes and only 15.6 % of carvacrol in the essential oil from *O. vulgare*.

The results obtained for carvacrol and eugenol are in agreement with what is reported in the literature.⁵³⁻⁵⁷ According to Ferreira et al.,⁴² carvacrol and eugenol interrupt lipid peroxidation reactions by donating hydrogen atoms with the subsequent formation of quinones and dimers. However, according to experiments by Yang et al.,⁵⁸ phenolic compounds can also decrease the formation of malonaldehyde (markers of lipid peroxidation) by forming stable complexes with iron ions and inhibiting Fenton reactions and the formation of reactive oxygen species in lipid systems. Although the direct chain-breaking antioxidant effect is the most expressive for these molecules, it is important to understand the complete mechanism by which eugenol and carvacrol protect lipid substrates and to understand how these molecules bind to metal ions such as iron.

3. 3. Electrochemical analysis

Cyclic voltammetry (CV) was used to study the electrochemical interaction between Fe(II) ions and the evaluated species (EDTA, eugenol, carvacrol, essential oils of *S. aromaticum* and *O. vulgare*) in the potential range of 0.0 at +1.2 V on a Ag/AgCl_{sat. KCl} electrode. The electrochemical behavior of Fe(II) was evaluated at different concentrations (Figure 2A). An anodic peak (E_{pa}) characteristic of the oxidation of Fe(II) to Fe(III) and two cathodic peaks (E_{pc}) that correspond to the process of reduction of Fe(III) ions to Fe(II) were observed, respectively. At the lowest concentration of Fe(II) (7 µg mL⁻¹), the anodic peak was observed at 0.5 V and presented a potential shift to more positive values of up to 0.75 V with increasing

concentrations of Fe_2SO_4 to $278 \mu\text{g mL}^{-1}$. The same behavior was observed for the cathodic peaks. The difference between the peak potentials (E_p) is an important parameter that characterizes the type of redox process and can be calculated by the expression: $E_p = (E_{pa} - E_{pc1}) \times 1000$. Taking the average of the oxidation potentials ($E_{pa} = 0.60$) and the average of the reduction potentials ($E_{pc1} = 0.25$) of the voltammograms obtained at increasing concentrations of Fe_2SO_4 , the difference between the peak potentials (E_p) of the oxidative process of the Fe(II)/Fe(III) redox pair is 350 mV, a value that characterizes an almost reversible behavior in an aqueous medium.⁵⁹ This fact means that the current generated in the electrochemical system is controlled both by the charge transfer and by the mass transport of the analyte from the solution volume to the electrode surface. That is, the current is not only directly proportional to the concentration of the electroactive species, but it depends on other factors in the reaction medium.^{59,60} Although the process is almost reversible, it can be seen in Figure 2 A' that the anodic current of Fe(II) is linearly related to the concentration of aqueous solution of Fe_2SO_4 and that the oxidation peak undergoes a potential shift to more positive values with the increase in concentration. When a ligand such as EDTA is added in increasing concentrations (2.5 to $500 \mu\text{g mL}^{-1}$) to an electrochemical cell containing a fixed concentration of Fe_2SO_4 ($139 \mu\text{g mL}^{-1}$), an exponential decrease in the anodic peak current values is observed in the electro-oxidation region of the Fe(II)/Fe(III) redox pair (Fig. 2 B'). A potential shift to more negative values, a behavior opposite to that observed in the voltammogram representing the Fe(II) curve (Fig. 2 A) can also be observed. This behavior of the electro-oxidation peak of the redox pair, when compared with the Fe_2SO_4 curve (Fig. 2 A and A'), suggests that the increase in the concentration of a ligand in the electrochemical cell causes a decrease in the concentration of Fe(II) ions. The addition

of $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of EDTA resulted in a decrease of 46.6% in the anodic current of the Fe(II)/Fe(III) redox pair. With the addition of $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ of EDTA, the anodic and cathodic current peaks disappeared, and they could no longer be calculated (Fig. S2. A - Supplementary Material).

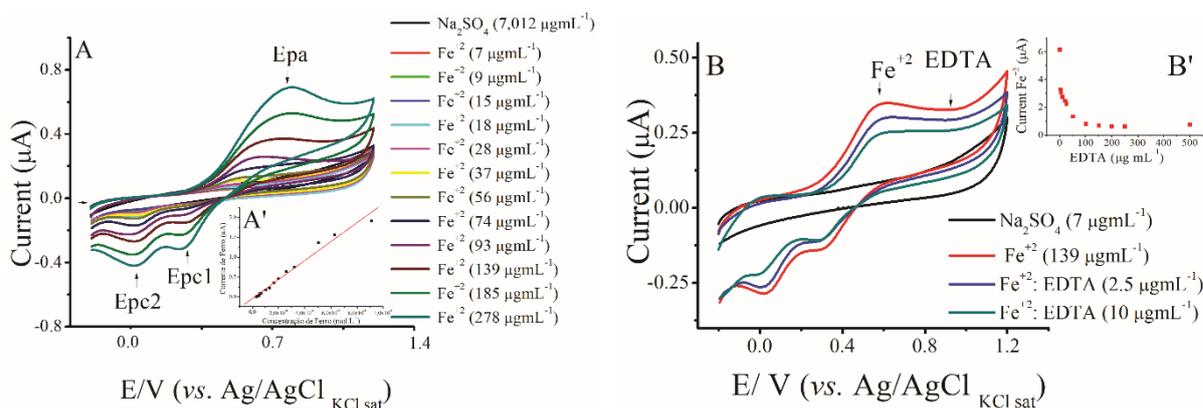


Figure 2. Cyclic voltammograms obtained on the surface of the glassy carbon electrode, the scanning speed 50 mV s^{-1} in 0.05 mol L^{-1} of sodium sulfate (Na_2SO_4). (A) Electrochemical behavior of isolated iron(II) ion ($[\text{Fe}(\text{SO}_4)] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in increasing concentration ($7\text{-}278 \mu\text{g mL}^{-1}$). (B) Electrochemical behavior of iron(II) ion ($[\text{Fe}(\text{SO}_4)] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) at $139 \mu\text{g mL}^{-1}$ in presence of increasing concentration of EDTA ($50\text{-}500 \mu\text{g mL}^{-1}$).

This effect can be attributed to the formation of complexes between Fe(II) ions and the chelator EDTA. According to Vega-Hernández et al.⁴⁴, the complexation of metal ions alters the kinetic and thermodynamic parameters of the dissolved ion, making it less reactive and even unavailable for oxidative processes. Thus, the decrease in the Fe(II) anodic current can be used to investigate the chelating effect of organic species on metal ions. In this sense, the electrochemical behavior of the essential oils of *S. aromaticum* and *O. vulgare* and their principal components eugenol and carvacrol in the presence of the redox pair Fe (II)/Fe (III) was studied by cyclic voltammetry under the same conditions used for the EDTA ligand (Figure 3 A to D).

The electrochemical behavior of essential oils differs slightly from the behavior of their respective principal constituents (eugenol and carvacrol; Figure 3). The current

intensity (μA) in the voltammogram obtained for the essential oil from *S. aromaticum* with Fe(II) (Fig. 3 A) is greater than that in the eugenol voltammogram (Fig. 3 B) because the presence of traces of (E)- β -Ocimene in the essential oil might have contributed to this higher current density. The inverse effect is observed for the voltammogram of *O. vulgare* (Fig. 3 C) and carvacrol (Fig. 3 D). Previous studies showed that only carvacrol in the essential oil from *O. vulgare* is electroactive on the surface of the electrode, which can explain the lower current density in the voltammograms of this essential oil.⁴²

The addition of both essential oils (Fig. 3A and 4C), as well as their principal components, in increasing concentrations (Fig. 3B and 4D) resulted in an exponential decrease in the anodic current of the redox pair Fe(II)/Fe(III), as is shown in Fig. 3 (A', B', C' and D'), following the same pattern found in EDTA voltammograms, with a sharp reduction up to the $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ concentration. The addition of $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of essential oils from *S. aromaticum* and *O. vulgare*, eugenol and carvacrol reduced the Fe(II) anodic current by 47.5, 3.9, 50.9 and 77.5%, respectively (Table S1-Supplementary material). Among all the compounds evaluated, the greatest capacity to reduce the Fe(II) anodic current was observed for carvacrol, followed by the *S. aromaticum* essential oil and eugenol, for which a similar Fe(II) current reduction profile was observed. *O. vulgare* essential oil was the least effective in reducing the anodic current in the Fe(II) electro-oxidation region. At the highest concentration, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, the decrease in the Fe(II) anodic current was 99.7, 89.3, 99.8, and 99.4% after the addition of the essential oils from *S. aromaticum* and *O. vulgare* and their principal constituents (eugenol and carvacrol), respectively. The interactions of essential oils and their principal components with Fe(II) ions presented electrochemical behaviors similar to that observed for the chelator EDTA (Fig. 2 B and B'). Vega-Hernández et al.⁴⁴ studied

the chelating effect of phenolic compounds such as rapanone (2,5-dihydroxy-3-tridecylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione) and, through electrochemical assays, verified the formation of rapanone complexes with Fe(II)/Fe(III) capable of inhibiting Fenton reactions because the formation of the complex inhibited the oxidation of Fe(II) ions and favored the reduction of Fe(III) to Fe(II) in the electrochemical system. According to Castelluccio et al.,⁶¹ the formation of chelates with transition metals is favored by phenolic compounds that contain groups with lone pairs in the *ortho* position in relation to the phenolic hydroxyl group.

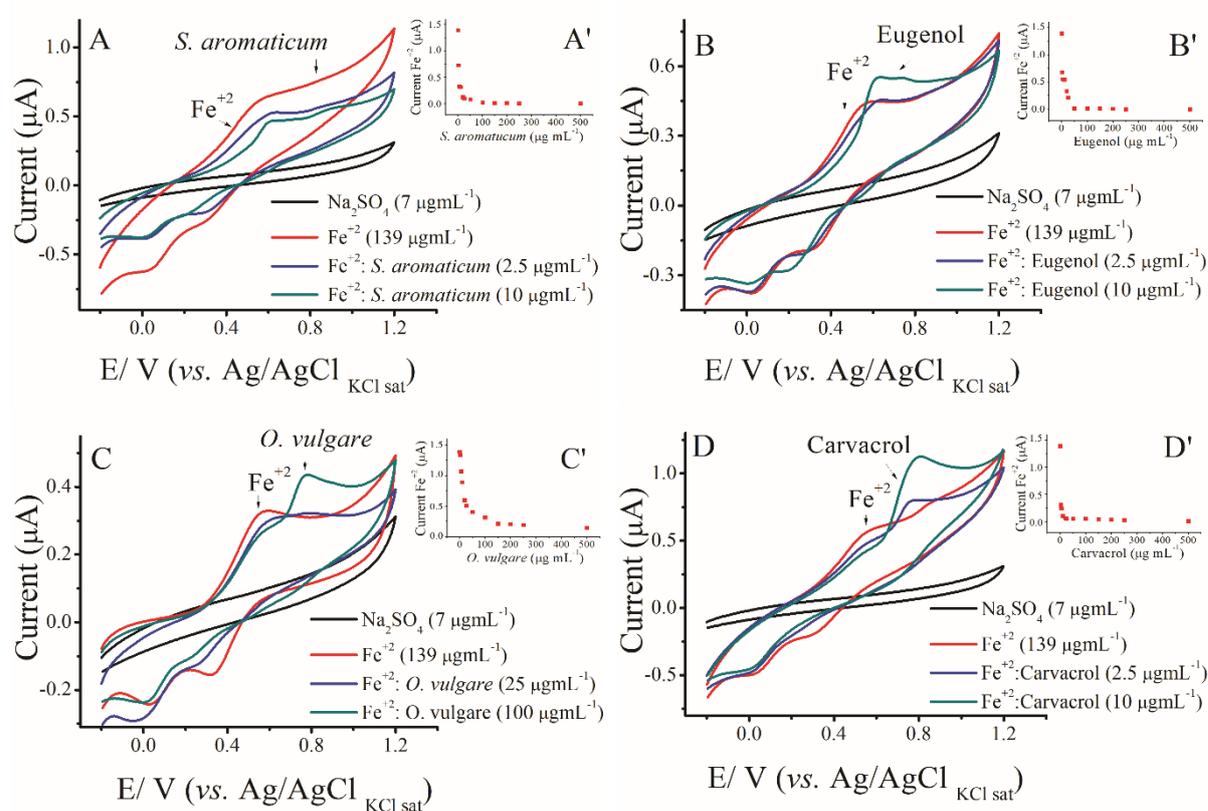


Figure 3. Cyclic voltammograms obtained on the surface of the glassy carbon electrode, the scanning speed 50 mV s^{-1} in 0.05 mol L^{-1} of sodium sulfate (Na_2SO_4). Electrochemical behavior of iron(II) ion ($[\text{Fe}(\text{SO}_4)] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) at $139 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ in presence of increasing concentration of *S. aromaticum* (A) and *O. vulgare* (C) essential oils, as well as their principal components eugenol (B) and carvacrol (D) ($50\text{-}500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$).

In addition to the decrease in the anodic current of Fe(II), the two cathodic peaks of the redox pair Fe(II)/Fe(III) converged in a single peak with the increase in the

concentration of the evaluated compounds. Furthermore, the electrochemical behavior of samples isolated at $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (EDTA, eugenol, carvacrol, essential oils of *S. aromaticum* and *O. vulgare*) differs significantly after interaction with Fe(II) ions (Figure S3 and S4 - Supplementary material). According to, Curnow et al.,⁶² these differences can be caused by considerable changes in the boundary orbitals involved in the redox process of the species after the formation of complexes. Computational tools and UV-vis spectroscopy were used to better understand the interaction between the phenolic compounds eugenol and carvacrol with Fe(II) ions.

3.4. UV-vis spectroscopy

The UV-vis spectra of eugenol, carvacrol and different iron(II)-eugenol (FeEU) and iron(II)-carvacrol (FeCar) (FeLigant = 1:1 to 1:6) systems obtained in ethanol are shown in Figure 4. Ethanol solutions of iron(II) ions in the presence of different concentrations of eugenol and carvacrol presented a bluish and yellow appearance, respectively. The intensity of the blue color was directly proportional to the eugenol concentration and a small variation in color intensity was observed for the FeCar mixture (Figure S5- Supplementary material). The characteristic electronic transitions of phenolic compounds ($\pi \rightarrow \pi^*$) can be observed in the 1.5 mM eugenol and carvacrol spectra (red line in Fig. 4 A and B), where two bands are observed in the near ultraviolet region at 210 and 270 nm.⁶³ The absorption spectra of eugenol and carvacrol underwent strong changes after their interaction with iron(II) ions, resulting in a strong bathochromic shift and a hyperchromic effect of the absorption bands of phenolic compounds, which now cover the entire range from 200 to 400 nm. In addition, a well-defined band, whose intensity varies with the concentration of eugenol and carvacrol, is observed in the region of 390 nm. In the visible region, in the range from 550 to 700 nm, a broad and

intense band appears in the eugenol spectrum (Fig. 4 A) with λ_{max} at 650 nm and a weak absorption band in the carvacrol spectrum (Fig. 4 B - expanded view of the region).

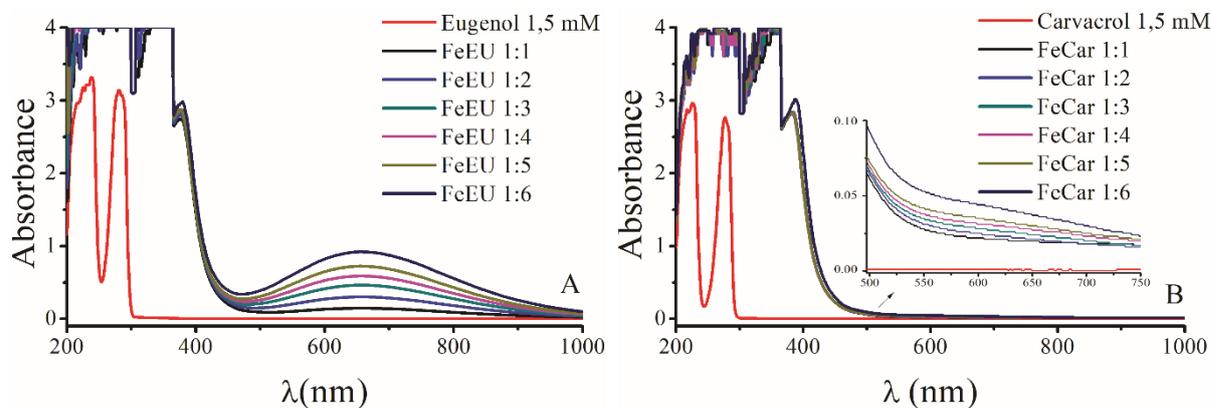


Figure 4. UV-spectra of interaction between Fe(II) ions and eugenol (A) and carvacrol (B) in decreasing proportion of Fe:Ligand (1:1 to 1:6).

Yang et al.⁵⁸ observed a strong bathochromic shift in the luteolin spectra after the interaction of the phenolic compound with iron ions. The authors also verified the appearance of a band at 390 nm, which they attributed to the formation of the Lutein-Fe(II) complex. Based on comparisons of iron complexes with phenolic ligands and taking into account the low signal intensity, the band in the 550- to 700-nm region can be attributed to the d-d transitions of d⁶ complexes.^{58,62,64,65} Comparing the eugenol spectra (A) with the carvacrol spectra (B), it is evident that the band in the visible region is more intense and more greatly shifted towards the red region in the eugenol spectrum. This difference between the spectra can be associated with greater stability of the iron(II)-eugenol complex than the iron(II)-carvacrol complex. The longer the absorption wavelength, the lower the energy level between the HOMO and LUMO molecular orbitals, which facilitates the electronic transitions.⁶² The probable geometry of the complexes formed and their energies were obtained through theoretical calculations.

3. 5. Computational analysis

The principal results for the stable molecular compounds of Fe(II) and Fe(III) and their bonding energies are shown Figure 5 and Table 2. Theoretical results indicate favorable thermodynamic conditions for the direct interaction of the Fe(II) and Fe(III) ions with eugenol and carvacrol. These interactions occur through the donation of the electron pair of oxygen atoms of ligands with the metal center, showing that these interactions should take place in accordance with the Lewis theory of acid-basis reactions. As it can be seen, carvacrol reacts to iron ions by means of one oxygen atom, whereas eugenol is stabilized by two chemical bonds with *ortho* oxygen atoms, clearly shown the formation of the chelate bonds. The computational results indicate that the chelate activity thermodynamically favors the formation of a very stable complex with three eugenol ligands, as is displayed in Figure 5. In contrast, the third ligand was not able to coordinate with the iron ions in the case of carvacrol. This fact can be due to the steric effect, which makes the approximation of the third ligand difficult. Larger values for bonding energies were obtained for eugenol than for carvacrol, as is displayed in Table 2. The average B3LYP/CBSB7 values in aqueous solutions are -13,47 and -5,45 kcal mol⁻¹ for the chemical bonds of eugenol with Fe(II) and Fe(III), respectively. The respective values for carvacrol compounds are -7,56 and -4,41 kcal mol⁻¹. In both cases, the bonding energies of the optimized complexes are larger for iron(II) than for iron(III) ions. These results indicate the preference of eugenol and carvacrol for reacting with Fe(II) than Fe(III), inhibiting the oxidation process. In addition, these results are in good agreement with electrochemical experimental results. These results are consistent with those found by Castelluccio et al.⁶¹; the presence of the methoxy group in eugenol might explain the greater ability to protect iron ions and the greater chelating activity for eugenol than for carvacrol.

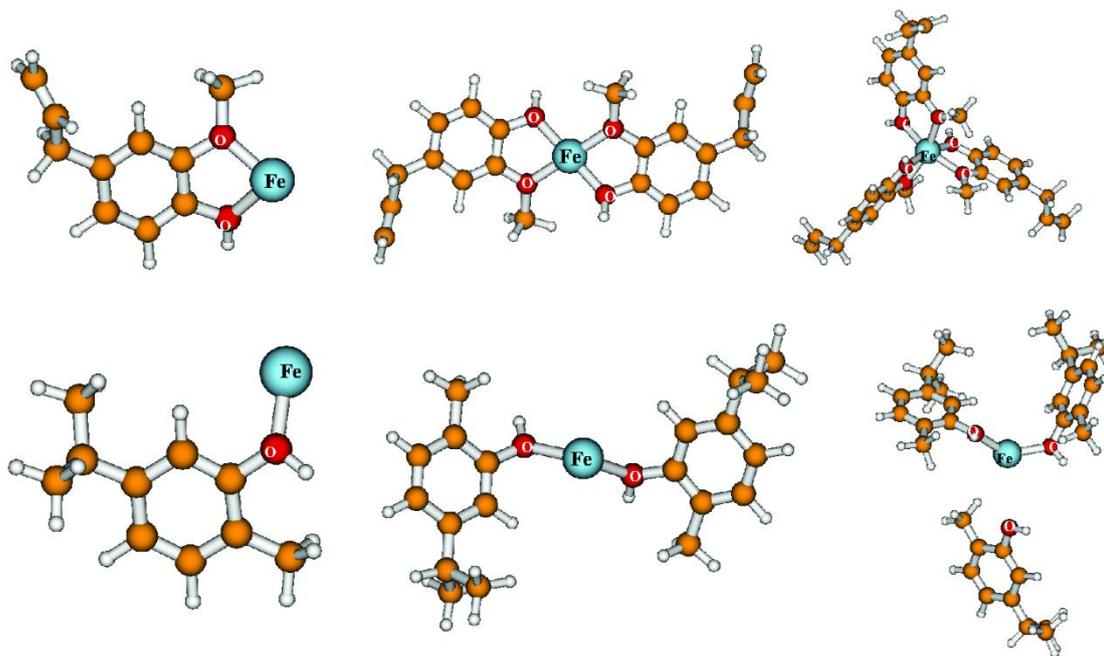


Figure 5. The B3LYP/CBSB7 optimized structures of iron compounds.

Table 2. The B3LYP/CBSB7 bonding energies ΔE_{Bond} in the gas-phase/water solution in kcal mol⁻¹.

Ligand number	Fe ²⁺		Fe ³⁺	
	Eugenol	Carvacrol	Eugenol	Carvacrol
1	-184.76/-16.89	-149.75/-8.73	-177.52/-8.45	-114.51/-7.95
2	-98.98/-15.23	-127.8/-6.39	-93.71/-5.97	-90.27/-4.87
3*	-48.41/-8.32		-36.34/-4.10	
3**	-57.65/-13.43		-27.08/-3.28	

* The distorted square pyramidal geometry.

** The distorted octahedral structure.

3. 6. Cytotoxicity analysis

The cytotoxic profiles of the essential oils from *S. aromaticum* and *O. vulgare* species were evaluated against CCD-1059Sk cells (fibroblast derived from normal skin). We observed reduced cell viability only in samples treated with high concentrations of these essential oils (around 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ or greater), indicating their low cytotoxicity against CCD-1059Sk cells (Figure 6). Similarly, the antioxidant substances (AAS and BHT) have weak cytotoxic activity in fibroblasts when cell viability was reduced in cultures treated with very high concentrations of these substances (around 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Eugenol also displayed low cytotoxicity in CCD-

1059Sk cells ($IC_{50} = 202.29 \pm 5.66 \mu\text{g mL}^{-1}$). However, its effect was more pronounced than that of the essential oil from *S. aromaticum*, even considering the high concentration of eugenol (96.3%) in this oil. The presence of the hydrocarbon, (E) β -ocimene, might have synergistically influenced the cytotoxicity of the essential oil. Apart of this fact, eugenol is considered safe by the Food and Drug Administration (FDA), and pro-apoptotic activity of eugenol was observed only when very high concentrations were used. Moreover, it has been demonstrated that eugenol is not a mutagenic or carcinogenic agent.^{66,67}

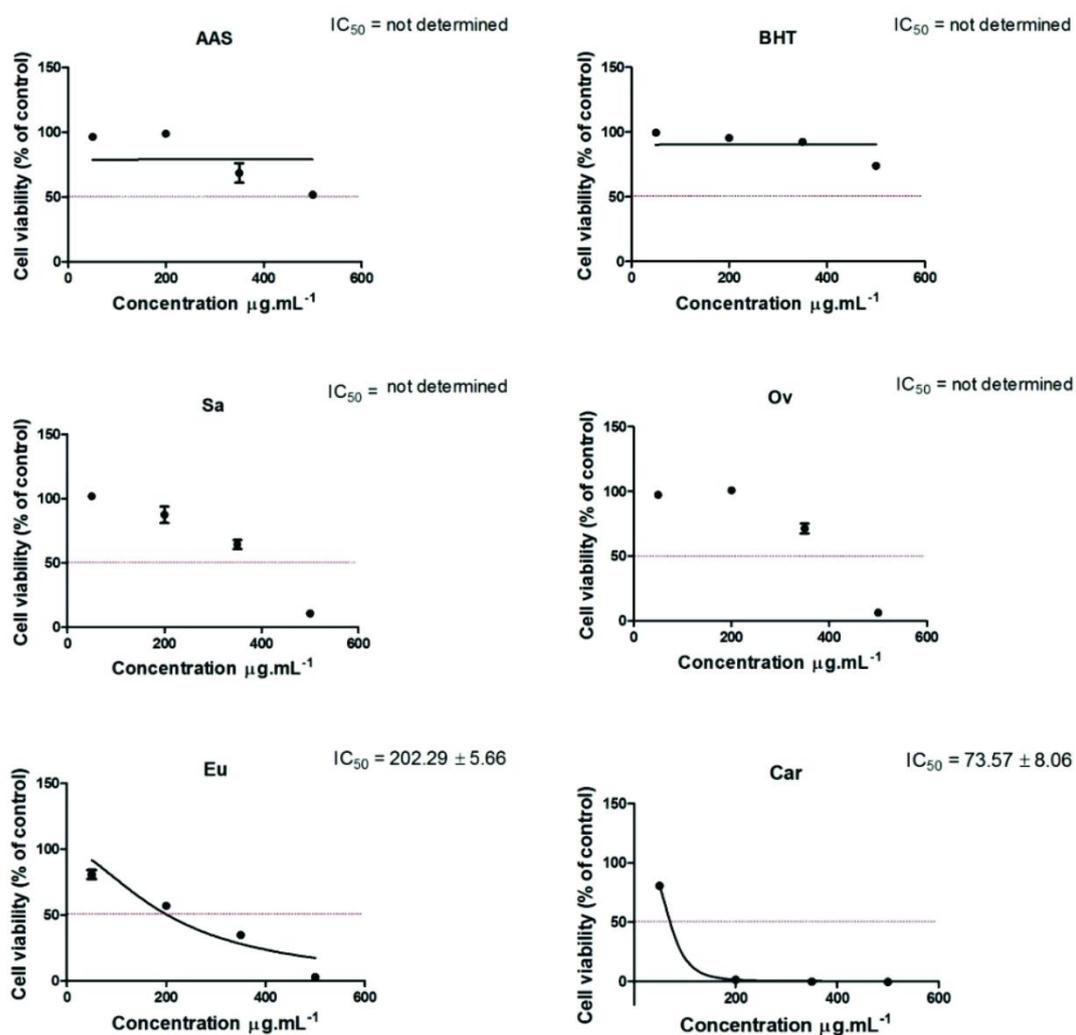


Figure 6. Cell viability determined from MTS assay. CCD-1059Sk cells were treated for 48 h.

The cytotoxic activity of carvacrol in CCD-1059Sk was higher ($IC_{50} = 73.57 \pm 8.06 \mu\text{g mL}^{-1}$) than that of the essential oil derived from *O. vulgare*. In general, the biological activity and the toxicity of the essential oils is closely associated with activity of their principal components. However, this event was not observed in the present study. It is possible that the cytotoxic activity of carvacrol has been modulated by other components present in the oil.⁶⁸ A variety of studies have demonstrated that essential oils and their isolated components can be useful in pharmacological e nutritional fields,⁶⁹⁻⁷¹ and, therefore, the determination of their cytotoxic profile is very relevant for establishing the safe dose for consumption.⁶⁹ We verified that both essential oils from *S. aromaticum* and *O. vulgare* display low cytotoxic activity against fibroblasts and that eugenol has a lower cytotoxic effect than carvacrol. Thus, they may be useful as food preservation agents considering their antioxidant and chelating properties.

In the present investigation, carvacrol and eugenol inhibited the formation of secondary lipid peroxidation compounds more efficiently than the antioxidant BHT in the TBARS assay. Carvacrol, the essential oil from *S. aromaticum* and eugenol were effective in reducing the anodic current of iron(II) ions in the electrochemical cell. According to the UV-vis spectra, carvacrol and eugenol are capable of forming complexes with iron(II) ions, with the Fe(II)-eugenol complex being more stable than the Fe(II)-carvacrol complex. The computational results indicate favorable thermodynamic conditions for the formation of a very stable complex with three eugenol ligands, whereas carvacrol coordinates with iron(II) ions through a single ligand. Low cytotoxic activities in fibroblasts were observed for the essential oils, and eugenol showed lower cytotoxicity than carvacrol. In general, the different methods converge to a similar reasoning: eugenol and carvacrol have a great ability to protect lipid substrates through direct preventive and chain-breaking antioxidant mechanisms and, upon further studies, they could act as valuable antioxidants in the food industry.

Conflicts of interest

“There are no conflicts to declare”.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - 001) for the financial support, scholarships and fellowships. And the authors thank the Central of Analysis and Chemical Prospecting of the Federal University of Lavras, Lavras-MG, Brazil.

The following support information is freely available on the ACS website:

Antioxidant activity versus concentration of samples in TBARS assays (Figure S1). Voltammograms overlap in increasing concentrations of EDTA (S2.A) essential oil of *S. aromaticum* (S2.B), eugenol (S2.C), essential oil of *O. vulgare* (S2.D) and carvacrol (S2.E) (Figure S2). Variation of the anodic current in the electro-oxidation region of the redox pair (Fe(II)/Fe(III)) (Table S1). Cyclic voltammograms obtained for EDTA (A), essential oil of *S. aromaticum* (B), eugenol (C), essential oil of *O. vulgare* (D) and carvacrol (E) at the 500 g mL⁻¹ concentration, in 139 g mL⁻¹ of Fe₂SO₄ (Figure S3). Cyclic voltammograms obtained for EDTA (A), essential oil of *S. aromaticum* (B), eugenol (C), essential oil of *O. vulgare* (D) and carvacrol (E) at the 500 µg mL⁻¹ concentration, in 7 µg mL⁻¹ of Na₂SO₄ (pH 7.4) (Figure S4). Ethanol solutions of Fe(II) ions (1.5 mM-FeCl₂) in the presence of different concentrations of eugenol (A) and carvacrol (B), the UV-Vis absorption spectra of the eugenol (C) and carvacrol (D) at 9.3 x 10⁻⁵ M (Figure S5).

Abbreviations Used

TBARS - Thiobarbituric Acid Reactive Substances

BHT - Butylated Hydroxytoluene

UV - Ultraviolet-visible

Fe(II) - iron(II) ions

Fe(III) - iron(III) ions

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid

FeEU - iron(II)-eugenol complex

FeCar - iron(II)-carvacrol complex

HOMO - Highest Occupied Molecule Orbital

LUMO - Lowest Un-occupied Molecular Orbital

References

1. Shi, C.; Zhao, X.; Liu, Z., Meng R.; Chen, X.; Guo, N. Antimicrobial, antioxidant, and antitumor activity of epsilon-poly-L-lysine and citral, alone or in combination. *Food Nut. Res.*, **2016**, 60(1), 31891. DOI: 10.3402/fnr.v60.31891.
2. Dhaiwal, K.; Chahal, K. K.; Kataria, D.; Kumar, A. Gas chromatography-mass spectrometry analysis and in vitro antioxidant potential of ajwain seed (*Trachyspermum ammi* L.) essential oil and its extracts. *J. Food Biochem.*, **2017**, 41(3), e12364. DOI: 10.1111/jfbc.12364.
3. Liu, L.; Jin, C.; Zhang, Y. Lipophilic phenolic compounds (Lipo-PCs): emerging antioxidants applied in lipid systems. *Rsc Adv.*, **2014**, 4(6), 2879-2891. DOI: 10.1039/C3RA44792H.
4. Canabady-Rochelle, L. L.; Selmeczi, K.; Collin, S.; Pasc, A.; Muhr, L.; Boschi-Muller, S. SPR screening of metal chelating peptides in a hydrolysate for their antioxidant properties. *Food chem.*, **2018**, 239, 478-485. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.06.116.
5. Carocho, M.; Morales, P.; Ferreira, I. C. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Scien. & Tech.*, **2018**, 71, 107-120. DOI:10.1016/j.tifs.2017.11.008.
6. Botterweck, A. A.; Verhagen, H.; Goldbohm, R. A.; Kleinjans, J.; Van den Brandt, P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. *Food Chem. Toxicol.*, **2000**, 38(7), 599-605. DOI:10.1016/S0278-6915(00)00042-9.

7. Bauer, A. K.; Dwyer-Nield, L. D.; Hankin, J. A.; Murphy, R. C.; Malkinson, A. M. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant C57BL/6 mice. *Toxicology*, **2001**, 169(1), 1-15. DOI:10.1016/S0300-483X(01)00475-9.
8. Vandghanooni, S.; Forouharmehr, A.; Eskandani, M.; Barzegari, A.; Kafil, V.; Kashanian, S.; Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. Cytotoxicity and DNA fragmentation properties of butylated hydroxyanisole. *DNA and cell biol.*, **2013**, 32(3), 98-103. DOI:10.1089/dna.2012.1946.
9. Barreira, J. C. M.; Ferreira, I. C. F. R. Artificial Antioxidants. *Encycl. Food Chem.*, **2019**, 283-290. DOI:10.1016/B978-0-08-100596-5.21600-4.
10. Gonçalves, N. D.; de Lima Pena, F.; Sartoratto, A.; Derlamelina, C.; Duarte, M. C. T.; Antunes, A. E. C.; Prata, A. S. Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. *Food Res. Int.*, **2017**, 96, 154-160. DOI:10.1016/j.foodres.2017.03.006.
11. Khorshidian, N.; Yousefi, M.; Khanniri, E.; Mortazavian, A. M. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, **2018**, 45, 62-72. DOI:10.1016/j.ifset.2017.09.020.
12. Girardi, N. S.; Passone, M. A.; García, D.; Nesci, A.; Etcheverry, M. Microencapsulation of *Peumus boldus* essential oil and its impact on peanut seed quality preservation. *Ind. Crops Prod.*, **2018**, 114, 108-114. DOI:10.1016/j.indcrop.2018.01.036.
13. Hassoun, A.; Çoban, Ö. E. Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products. *Trends Food Sci. Technol.*, **2017**, 68, 26-36. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.07.016.
14. Jemaa, M. B.; Falleh, H.; Serairi, R.; Neves, M. A.; Snoussi, M.; Isoda, H.; Nakajima, M.; Ksouri, R. Nanoencapsulated *Thymus capitatus* essential oil as natural preservative. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, **2018**, 45, 92-97. DOI:10.1016/j.ifset.2017.08.017.
15. Ju, J.; Xu, X.; Xie, Y.; Guo, Y.; Cheng, Y.; Qian, H.; Yao, W. Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth on baked foods. *Food chem.*, **2018**, 240, 850-855. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.07.120.
16. Alakomi, H. L.; Maukonen, J.; Honkapää, K.; Storgårds, E.; Quirin, K. W.; Yang, B.; Saarela, M. Effect of plant antimicrobial agents containing marinades on storage stability and microbiological quality of broiler chicken cuts packed with modified atmosphere packaging. *J. Food Prot.*, **2017**, 80(10), 1689-1696. DOI:10.4315/0362-028X.JFP-17-076.
17. Baj, T.; Baryluk, A.; Sieniawska, E. Application of mixture design for optimum antioxidant activity of mixtures of essential oils from *Ocimum basilicum* L., *Origanum*

- majorana L. and Rosmarinus officinalis L. *Ind. Crops Prod.*, **2018**, 115, 52-61. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.02.006.
18. Dimitrijević, M.; Grković, N.; Bošković, M.; Baltić, M. Ž.; Dojčinović, S.; Karabasil, N., Vasilev, D.; Teodorović, V. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth on vacuum packaged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with carvacrol and eugenol. *J. Food Saf.*, **2019**, 39(1), e12553. DOI:10.1111/jfs.12553.
 19. Radünz, M.; da Trindade, M. L. M.; Camargo, T. M.; Radünz, A. L.; Borges, C. D.; Gandra, E. A.; Helbig, E. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. *Food chem.*, **2019**, 276, 180-186. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.09.173.
 20. Morshedloo, M.R.; Mumivand, H.; Craker, L.E.; Maggi, F. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils in *Origanum vulgare* subsp. *gracile* at different phenological stages and plant parts. *J. Food Process Preserv.*, **2018**, 42(2), e13516. DOI: 10.1111/jfpp.13516.
 21. Allen, K. E. Metal chelators as antioxidants for food preservation. In *Handbook of antioxidants for food preservation*. Woodhead Publishing, 2015; pp 79-104. DOI:10.1016/B978-1-78242-089-7.00004-X.
 22. Sheikh, N.A.; Desai, T.R.; Tirgar, P.R. Evaluation of iron chelating and antioxidant potential of *Epilobium hirsutum* for the management of iron overload disease. *Biomed. Pharmacother.*, **2017**, 89, 1353-1361. DOI:10.1016/j.biopha.2017.02.079.
 23. Penu, R.; Litescu, S.C.; Eremia, S.A.; Vasilescu, I.; Radu, G.L.; Giardi, M.T.; Pezzotti, G.; Rea, G. Application of an optimized electrochemical sensor for monitoring astaxanthin antioxidant properties against lipoperoxidation. *New J. Chem.*, **2015**, 39(8), 6428-36. DOI: 10.1039/c5nj00457h.
 24. Ogiwara, Y.; Roman, M.J.; Decker, E.A.; Goddard, J.M. Iron chelating active packaging: Influence of competing ions and pH value on effectiveness of soluble and immobilized hydroxamate chelators. *Food chem.*, **2016**, 196, 842-847. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.10.029.
 25. Bakır, T.; Sayiner, H.S.; Kandemirli, F. Experimental and theoretical investigation of antioxidant activity and capacity of thiosemicarbazones based on isatin derivatives. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **2018**, 193(8), 493-499. DOI:10.1080/10426507.2018.1452232.
 26. Benayahoum, A.; Bouakkaz, S.; Bordjiba, T.; Abdaoui, M. Antioxidant activity and pka calculations of 4-mercaptostilbene and some derivatives: A theoretical approach. *J. Mol. Liq.*, **2019**, 275, 221-231. DOI:10.1016/j.molliq.2018.11.092.
 27. Pantaleone, S.; Ugliengo, P.; Sodupe, M.; Rimola, A. When the Surface Matters: Prebiotic Peptide-Bond Formation on the TiO₂ (101) Anatase Surface through Periodic DFT-D2 Simulations. *Chem. - Eur. J.*, **2018**, 24, 16292-16301. DOI:10.1002/chem.201803263.

28. Khaldi-Khellafi, N.; Makhloufi-Chebli, M.; Oukacha-Hikem, D.; Bouaziz, S.T.; Lamara, K.O.; Idir, T.; Benazzouz-Touami, A.; Dumas, F. Green synthesis, antioxidant and antibacterial activities of 4-aryl-3,4 dihydropyrimidinones/thiones derivatives of curcumin. Theoretical calculations and mechanism study. *J. Mol. Struct.*, **2019**, 1181, 261-269. DOI:10.1016/j.molstruc.2018.12.104.
29. Hemachandran, K.; Anbusrinivasan, P.; Ramalingam, S.; Manoharan, C.; Aarthi, R. Biological and structural properties' interpretation on antitumour drug 3-(2-aminoethyl) indole (tryptamine) using molecular spectroscopy and computational tools. *J. Taibah Univ. Medical Sci.*, **2019**, 13(1), 231-247. DOI: 10.1080/16583655.2018.1559008.
30. Chipiso, K.; Duc, T.; Simoyi, R.H. Kinetics and Mechanism of Oxidation of N-acetyl-d-penicillamine in Acidified Iodate and Aqueous Iodine. *S. Afr. J. Chem.*, **2019**, 72(1), 1-9. eISSN: 0379-4350.
31. Cheng, Q.; Teng, Q.; Marchitti, S.A.; Dillingham, C.M.; Kenneke, J.F. An Integrated Experimental and Computational Approach for Characterizing the Kinetics and Mechanism of Triadimefon Racemization. *Chirality*, **2016**, 28, 633-641. DOI:10.1002/chir.22622.
32. Lee, C.C.; Jordan, D.B.; Stoller, J.R.; Kibblewhite, R.E.; Wagschal, K. Biochemical characterization of *Caulobacter crescentus* xylose dehydrogenase. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**, 118, 1362-1367. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.06.124.
33. Habibi-Khorassani, S.M.; Shahraki, M.; Dehdab, M. A Comparative Mechanistic and Kinetic Study of the Synthesis Reaction of 3, 4, 5-Substituted Furan-2(5H)-ones: Solvent Effect. *ChemistrySelect.*, **2016**, 1, 6069-6078. DOI:10.1002/slct.201600435.
34. Altun, A.; Swesi, O.A.A.; Alhatab, B.S.S. Structural and spectroscopic (UV-Vis, IR, Raman, and NMR) characteristics of anisaldehydes that are flavoring food additives: A density functional study in comparison with experiments. *J. Mol. Struct.*, **2017**, 1128, 590-605. DOI: 10.1016/j.molstruc.2016.09.035.
35. Gu, H.; Shi, H.; Sun, Y.; Xu, H. Theoretical study of extrinsic fluorescence probe reacting with volatile organic compounds. *Mater. Express.*, **2018**, 8(1), 93-98. DOI:10.1166/mex.2018.1408.
36. Singh, R.; Mishra, V.K.; Singh, H.K.; Sharma, G.; Koch, B.; Singh, B.; Singh, R.K. Mg co-ordination with potential carcinogenic molecule acrylamide: Spectroscopic, computational and cytotoxicity studies. *J. Mol. Struct.*, **2018**, 1155, 330-336. DOI:10.1016/j.molstruc.2017.10.095.
37. Tošović, J.; Marković, S.; Marković, J.M.D.; Mojović, M.; Milenković, D. Antioxidative mechanisms in chlorogenic acid. *Food Chem.*, **2017**, 237, 390-398. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.05.080.
38. Zhang W, Liu H, Zhang F, Wang YL, Song B, Zhang R, Yuan J. Development of a ruthenium(II) complex-based luminescence probe for detection of hydrogen sulfite in food samples. *Microchem. J.*, **2018**, 141, 181-187. DOI:10.1016/j.microc.2018.05.031.

39. Serobatse, K.R.N.; Kabanda, M. A theoretical study on the antioxidant properties of methoxy-substituted chalcone derivatives: A case study of kanakugiol and pedicellin through their Fe (II and III) coordination ability. *J. Theo. Comp. Chem.*, **2016**, 15(6), 1650048. DOI:10.1142/S0219633616500486.
40. Medina, J.J.M.; Ferrer, E.G.; Williams, P.A.M.; Okulik, N.B. Theoretical/experimental investigation and antimutagenic effect of the oxidovanadium(IV) baicalin coordination complex. *Inorg. Chim. Acta.*, **2019**, 487, 369–378. DOI:10.1016/j.ica.2018.12.042.
41. De Oliveira, N.P.; Cardoso, M.G.; Guerreiro, M.C.; de Almeida, K.J. A theoretical study about reactivity and spectroscopic properties of copper ions toward sulfur-containing species. *Comp. Theor. Chem.*, **2019**, 1149, 69–77. DOI:10.1016/j.comptc.2019.01.005.
42. Ferreira, V.R.F.; Brandão, R.M.; Freitas, M.P.; Saczk, A.A.; Felix, F.S.; Silla, J.M.; Teixeira, M.L.; Cardoso, M.G. Colorimetric, electroanalytical and theoretical evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium aromaticum* L., *Origanum vulgare* L., *Mentha spicata* L. and *Eremanthus erythropappus* M. essential oils, and their major constituents. *New J. Chem.*, **2019**, 43(20), 7653-7662. DOI: 10.1039/C8NJ05893H.
43. Bounatirou, S.; Smiti, S.; Miguel, M. G.; Faleiro, L.; Rejeb, M. N.; Neffati, M.; Costa, M. M.; Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Pedro, L. G. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food chem.*, **2007**, 105(1), 146-155. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.03.059.
44. Vega-Hernández, K.; Antuch, M.; Cuesta-Rubio, O.; Núñez-Figueroa, Y.; Pardo-Andreu, G.L. Discerning the antioxidant mechanism of rapanone: A naturally occurring benzoquinone with iron complexing and radical scavenging activities. *J. Inorg. Biochem.*, **2017**, 170, 134-147. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.02.019.
45. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R.G. Development of the Colic-Salvetti correlation-energy into a functional of the electron density. *Physical review B.*, **1988**, 37(2), 785-789. DOI:https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785.
46. Montgomery, J.A.; Frisch, M.J.; Ochterski, J.W.; Petersson, G.A. A complete basis set model chemistry. VII. Use of the minimum population localization method. *J. Chem. Phys.*, **2000**, 112, 6532-6542. DOI:10.1063/1.481224.
47. Risorgimento V, Generale C, Uni V, Area P. Polarizable continuum model (PCM) calculations of solvent effects on optical rotations of chiral molecules, *J. Phys. Chem.* **2002**, 106 (25),6102–6113. DOI:10.1021/jp020124t.
48. Gaussian 09, Revision D.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr. J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J.

- Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. € Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
49. Promega, C. 96® **AQueous One Solution Cell Proliferation Assay**. Technical Bulletin, 2005.
50. FERREIRA, D. F. Sisvar: a computerstatistic alanalysis system. *Ciê. Agrotec.*, **2011**, 35, 1039–1042. DOI:10.1590/S1413-70542011000600001.
51. de Oliveira, M.S.; da Costa, W.A.; Pereira, D.S.; Botelho, J.R.; Menezes, T.O. de A.; Andrade, E.H. de A.; da Silva, S.H.; Filho, AP da S. S.; Junior, R.N. de C. Chemical composition and phytotoxic activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil obtained with supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids*, **2016**, 118, 185-193. DOI:10.1016/j.supflu.2016.08.010.
52. Morshedloo, M.R.; Craker, L.E.; Salami, A.; Nazeri, V.; Sang, H.; Maggi, F. Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono-and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. *Plant Physiol. Biochem.*, **2017**, 111, 119-128. DOI:10.1016/j.plaphy.2016.11.023.
53. Amorati, R.; Foti, M. C.; Valgimigli, L. Antioxidant activity of essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, **2013**, 61(46), 10835-10847. DOI:10.1021/jf403496k.
54. Dutra, T. V.; Castro, J. C.; Menezes, J. L.; Ramos, T. R.; do Prado, I. N.; Junior, M. M.; Mikcha, J. M. G.; de Abreu Filho, B. A. Bioactivity of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil against *Alicyclobacillus* spp. *Ind. Crops Prod.*, **2019**, 129, 345-349. DOI:10.1016/j.indcrop.2018.12.025.
55. Kamal, I.; Khedr, A. I.; Alfaifi, M. Y.; Elbehairi, S. E. I.; Elshaarawy, R. F.; Saad, A. S. Chemotherapeutic and chemopreventive potentials of p-coumaric acid–Squid chitosan nanogel loaded with *Syzygium aromaticum* essential oil. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2021**, 188, 523-533. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.08.038.
56. Radünz, M.; da Trindade, M.L.; Camargo, T.M.; Radünz, A.L.; Borges, C.D.; Gandra, E.A.; Helbig, E. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. *Food chem.*, **2019**, 276, 180-186. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.09.173.
57. Mechergui, K.; Jaouadi, W.; Coelho, J. P.; Khouja, M. L. Effect of harvest year on production, chemical composition and antioxidant activities of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* subsp glandulosum (Desf.) Ietswaart) growing in North Africa. *Ind. Crops Prod.*, **2016**, 90, 32-37. DOI:10.1016/j.indcrop.2016.06.011.
58. Yang, A. H.; Shi, X. Y.; Li, X.; Li, F. F.; Zhang, Q. Q.; Jiang, S. X.; Cui, J. Z.; Gao, H. L. Spectroscopic and electrochemical studies on the evaluation of the radical scavenging

- activities of luteolin by chelating iron. *Rsc Advances.*, **2014** 4(48), 25227-25233. DOI: 10.1039/C4RA01396D.
59. Hoyos-Arbeláez, J.; Vázquez, M.; Contreras-Calderón, J. Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review. *Food chem.*, **2017**, 221, 1371-1381. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.11.017.
60. Fathi, A. M.; Mandour, H. S.; HassaneAnouar, E. Characteristics of multidentate Schiff base ligand and its complexes using cyclic voltammetry, fluorescence, antimicrobial behavior and DFT-calculations. *J. Mol. Struct.*, **2021**, 1224, 129263. DOI:10.1016/j.molstruc.2020.129263.
61. Castelluccio, C.; Paganga, G.; Melikian, N.; Bolwell, G.P.; Pridham, J.; Sampson, J.; Rice-Evans, C. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *Febs Lett.*, **1995**, 368, 188-192. 1571l. DOI:10.1016/0014-5793(95)00639-Q.
62. Curnow, O. J.; Fern, G. M.; Klaib, S.; Böhme, U.; Lang, H.; Holze, R. Structure–molecular orbital energy correlations in Me₃Si-substituted bis (indenyl) iron complexes evidenced with UV–vis spectroscopy and cyclic voltammetry. *J. Electroanal. Chem.*, **2005**, 585(2), 167-171. DOI:10.1016/j.jelechem.2005.05.016.
63. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; Bryce, D. L. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 8th Revised ed. John Wiley & Sons., 2014 p 464, ISBN: 978-0-470-61637-6
64. Huang, X.; Zhao, S.; Abu-Omar, M.; Whelton, A. J. In-situ cleaning of heavy metal contaminated plastic water pipes using a biomass derived ligand. *J. Environ. Chem. Eng.*, **2017**, 5(4), 3622-3631. DOI:10.1016/j.jece.2017.07.003.
65. Zhang, Q.; Jin, B.; Feng, S.; Zheng, T.; Wang, X.; Guo, Z.; Peng, R. New hexadentate tris (dopamine) as iron chelating agent: Synthesis, solution thermodynamic stability and antioxidant activity studies. *Polyhedron.*, **2019**, 160, 261-267. DOI:10.1016/j.poly.2018.12.053.
66. da Silva Gündel, S.; dos Reis, T. R.; Copetti, P. M.; Favarin, F. R.; Sagrillo, M. R.; da Silva, A. S.; Segat, J. C.; Baretta, D.; Ourique, A. F. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity of nanoemulsions containing Mancozeb and Eugenol. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2019**, 169, 207-215. DOI:10.1016/j.ecoenv.2018.11.023.
67. FDA - Food and Drug Administration. In: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=172.515>. (Accessed April 2020).
68. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils–a review. *Food Chem. Toxicol.*, **2008**, 46, 446-475. DOI:10.1016/j.fct.2007.09.106.
69. Pereira, P.S.; Maia, A.J.; Duarte, A.E.; Oliveira-Tintino, C.D.; Tintino, S.R.; Barros, L.M.; Vega-Gomez, M.C.; Rolón, M.; Coronel, C.; Coutinho, H.D.; da Silva, T.G.

- Cytotoxic and anti-kinetoplastid potential of the essential oil of *Alpinia speciosa* K. Schum. *Food Chem. Toxicol.*, **2018**, 119, 87-391. DOI: 10.1016/j.fct.2018.01.024.
70. Sánchez-González, L.; Vargas, M.; González-Martínez, C.; Chiralt, A.; Cháfer, M. Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. *Food Eng. Rev.*, **2011**, 3, 1-6. DOI 10.1007/s12393-010-9031-3.
71. Ghabraie, M.; Vu, K.D.; Tata, L.; Salmieri, S.; Lacroix, M. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT--Food Science and Technology.*, **2016**, 66, 332-339. DOI:10.1016/j.lwt.2015.10.055.

Electronic Supplementary Information for

ACS Food Science and Technology

Antioxidant and Cytotoxic Activity of Essential Oils and their Principal Components:
Spectrophotometric, voltammetric and theoretical investigation of the chelating effect of
eugenol and carvacrol

Vanuzia Rodrigues Fernandes Ferreira^a, Isabela Aparecida Militani^a, Katia Julia de
Almeida^a, Allan da Silva Lunguinho^a, Adedir Aparecida Saczk^a, Marisa Ionta^b, Guilherme
Álvaro Ferreira da Silva^b, Fabiana Silva Felix^a, David Lee Nelson^c and Maria das Graças
Cardoso^{*a}

^a*Chemistry Department, Federal University of Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brazil;*

^b*Department of Cell Biology, Federal University of Alfenas, 37130-000, Alfenas-MG, Brazil;*

^c*Postgraduate Program in Biofuels, Federal University of The Jequitinhonha and Mucuri
Valleys, 39100-900, Diamantina-MG, Brazil.*

*** Corresponding author:** mcardoso@ufla.br

Cx. Postal 3037, 37.200.000 – Lavras-MG

Phone: +55 35 3829-1202 Fax: +55 35 3829-1271

Figure S1. The TBARs assays of dose-dependent curve of the percentage of antioxidant activity versus concentration of samples. Each data point is the mean of the TRIPPLICATE

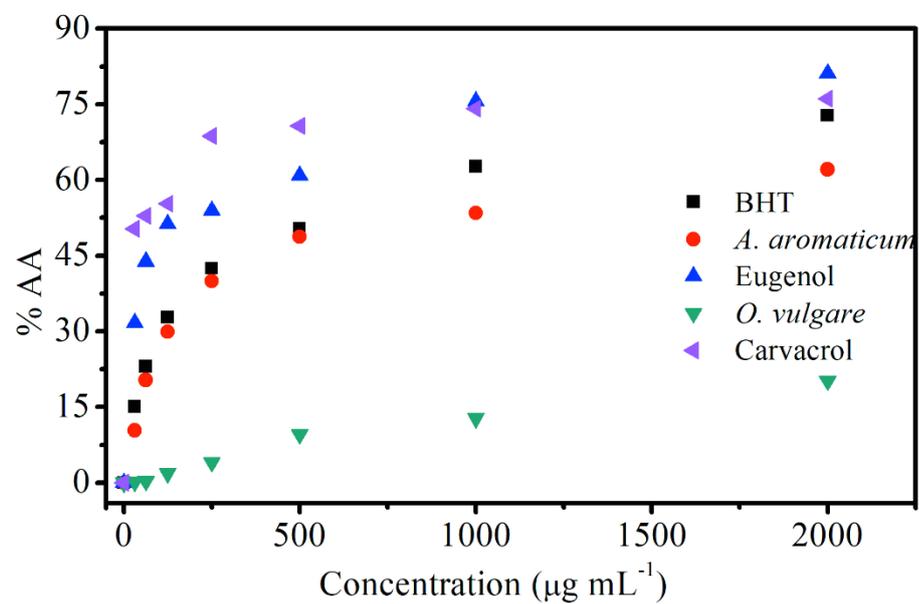
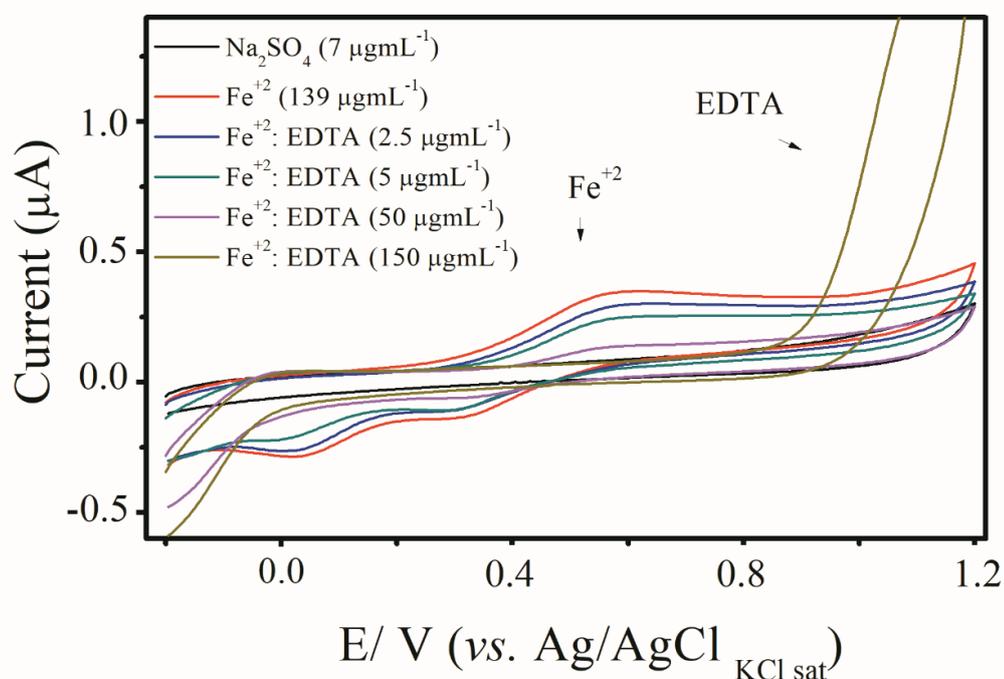
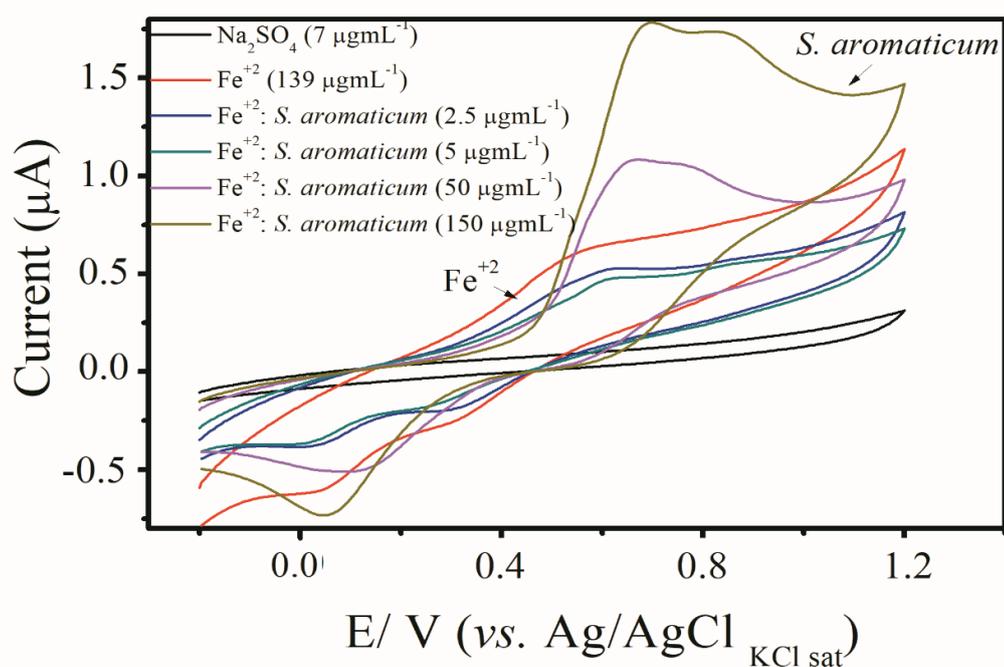


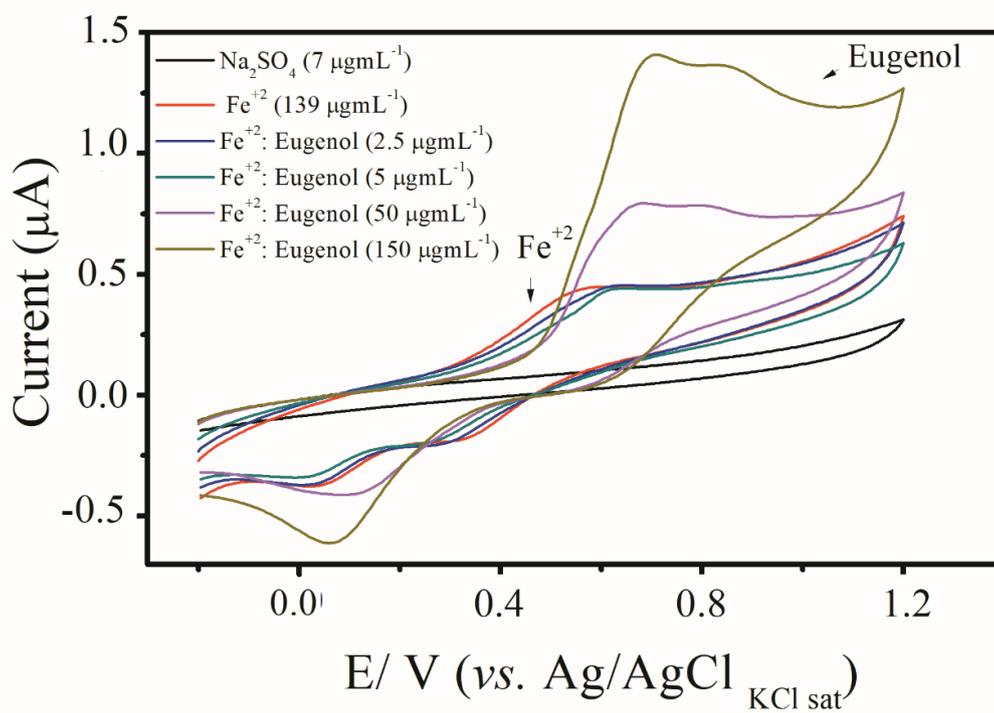
Fig S2. Voltamograms overlap in increasing concentrations of EDTA (1S.A) essential oil of *S. aromaticum* (1S.B), eugenol (1S.C), essential oil of *O. vulgare* (1S.D) and carvacrol (1S.E) , in $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Na_2SO_4 (pH 7.4) and $139 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Fe_2SO_4 .



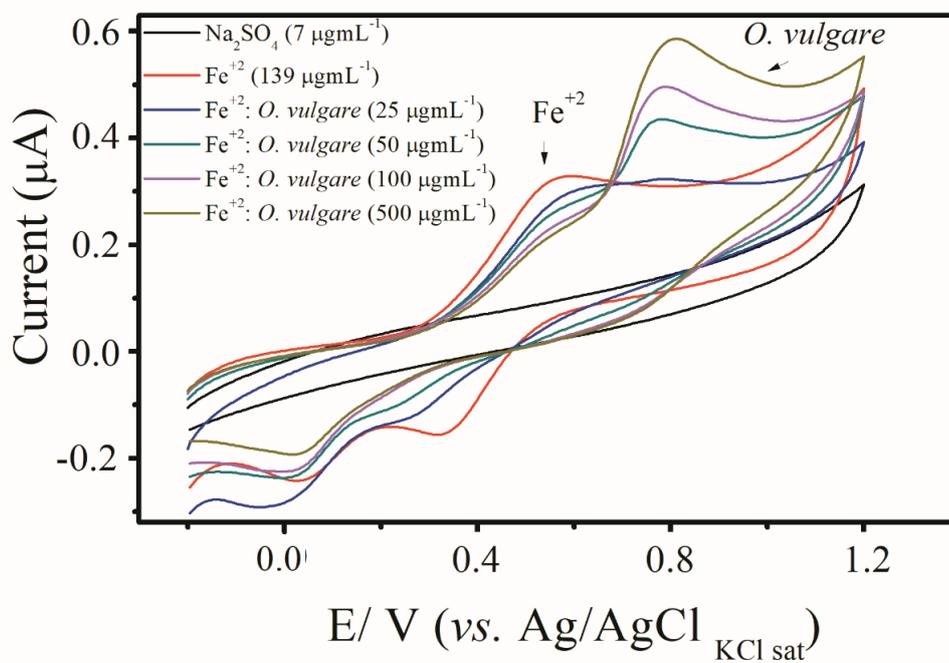
S2.A



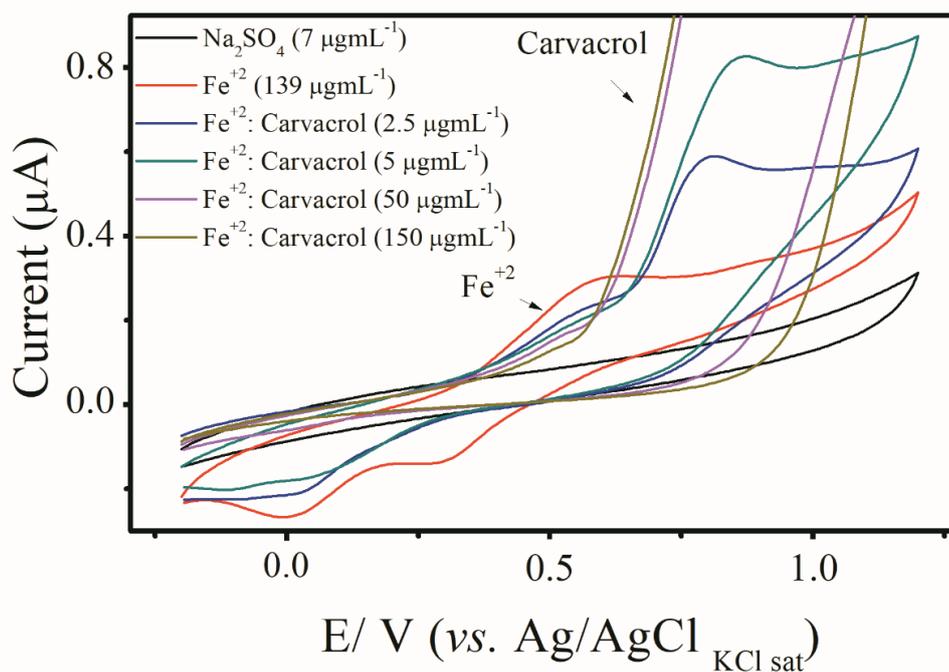
S2.B



S2.C



S2.D



S2.E

Table 1S: Variation of the anodic current in the electro-oxidation region of the redox pair (Fe(II)/Fe(III)) with increasing addition of essential oil of *S. aromaticum* and *O. vulgare* and their major components eugenol and carvacrol, respectively.

Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Anodic Current Fe^{+2} (μA) in 0.50 E/ V (vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{KCl sat}}$)			
	<i>S. aromaticum</i>	Eugenol	<i>O. vulgare</i>	Carvacrol
0	1.390	1.390	1.390	1.390
2.5	0.730	0.682	1.336	0.312
5	0.334	0.554	1.072	0.241
10	0.319	0.551	0.890	0.101
20	0.127	0.335	0.595	0.067
25	0.102	0.221	0.506	0.054
50	0.084	0.023	0.405	0.053
100	0.022	0.018	0.317	0.051
150	0.017	0.016	0.215	0.048
200	0.016	0.015	0.206	0.037
250	0.004	0.004	0.193	0.030
500	0.003	0.002	0.148	0.008

Figure S3. Cyclic voltammograms obtained for EDTA (A), essential oil of *S. aromaticum* (B), eugenol (C), essential oil of *O. vulgare* (D) and carvacrol (E) at the 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration, in 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of Na_2SO_4 (pH 7.4) and 139 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of Fe_2SO_4 .

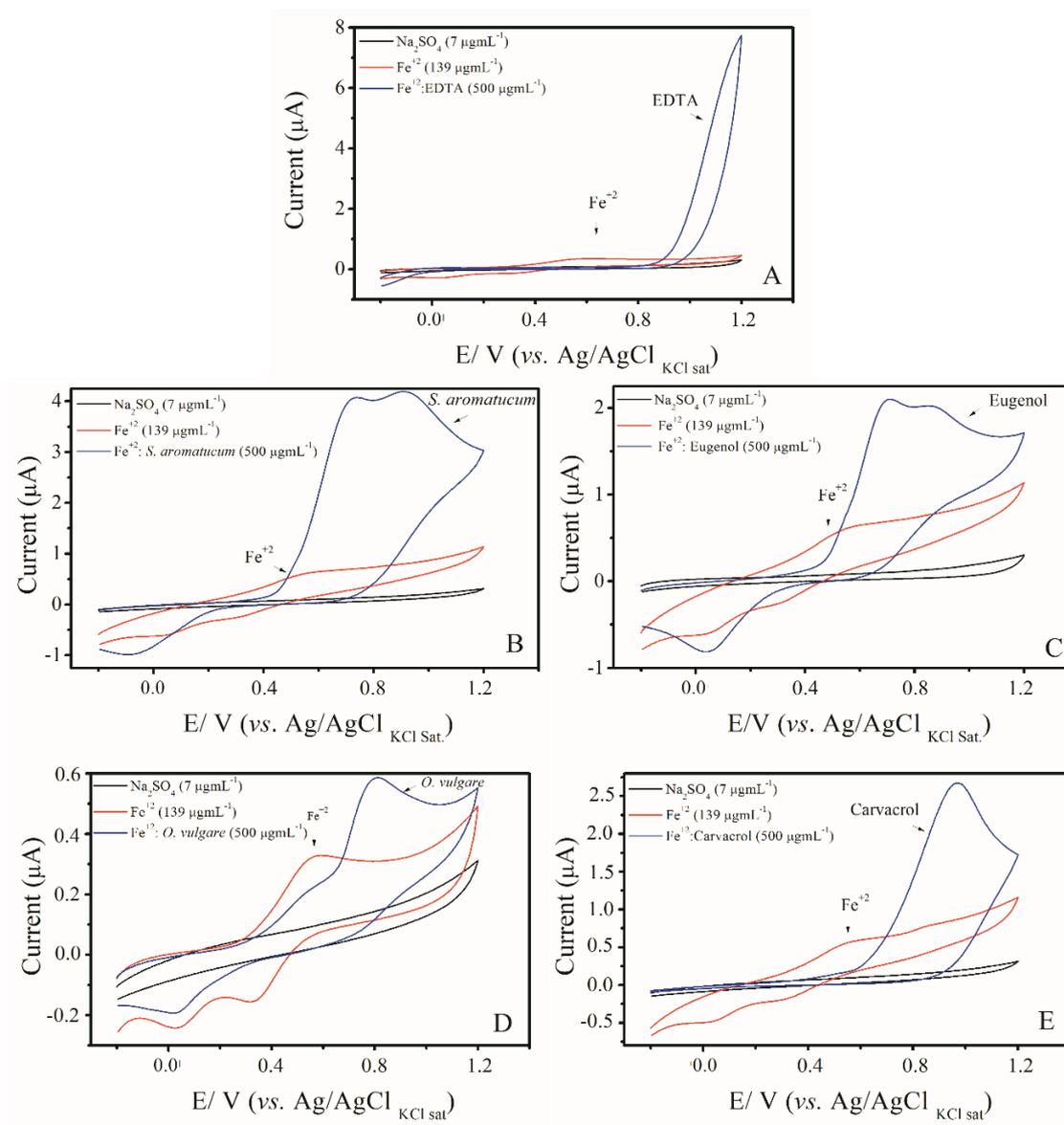


Figure S4. Cyclic voltammograms obtained for EDTA (A), essential oil of *S. aromaticum* (B), eugenol (C), essential oil of *O. vulgare* (D) and carvacrol (E) at the 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration, in 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of Na_2SO_4 (pH 7.4).

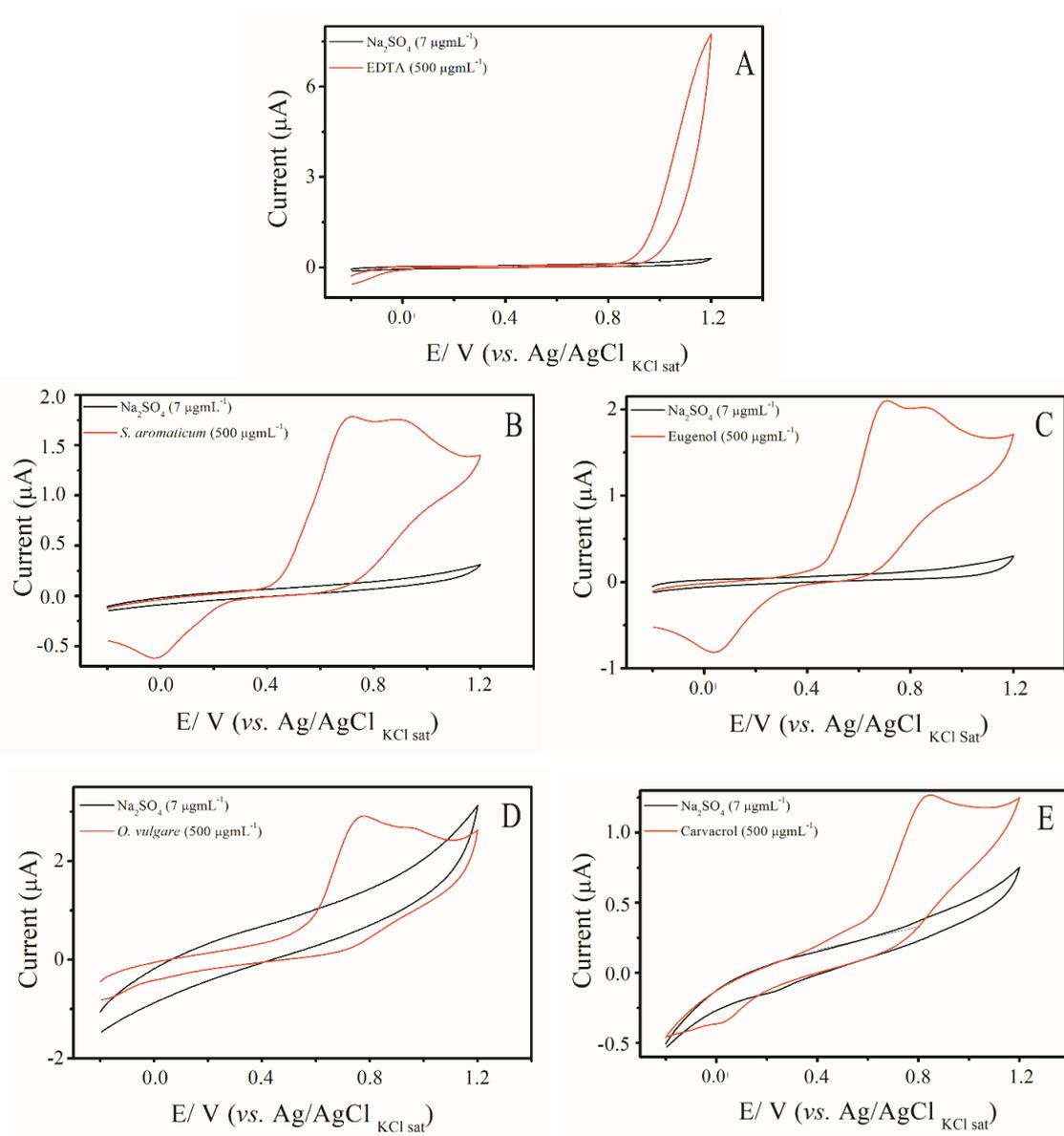
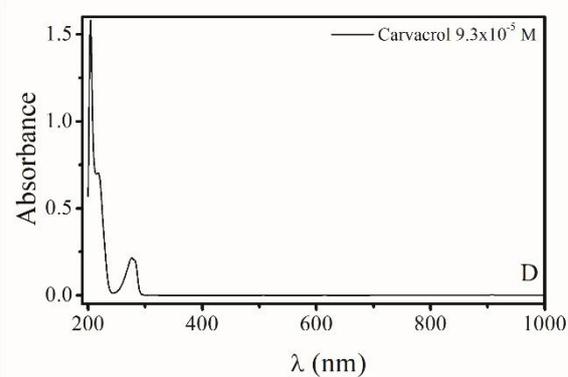
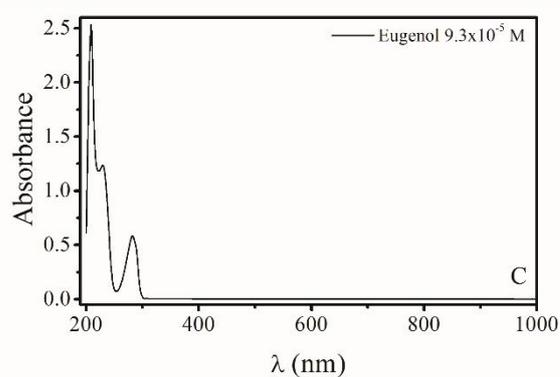


Figure S5: Ethanol solutions of Fe(II) ions (1.5 mM-FeCl₂) in the presence of different concentrations of eugenol (A) and carvacrol (B). The UV-Vis absorption spectra of the eugenol (C) and carvacrol (D) at 9.3×10^{-5} M.



ARTIGO II – SYNTHESIS OF EUGENOL DERIVATIVES: EVALUATION OF THE STRUCTURAL INFLUENCE ON OXIDATIVE STABILITY, ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC PROPERTIES.

Artigo submetido ao Conselho Editorial do periódico “Journal of Natural Products” e formatado conforme normas do referido periódico.

SYNTHESIS OF EUGENOL DERIVATIVES: EVALUATION OF THE STRUCTURAL INFLUENCE ON OXIDATIVE STABILITY, ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC PROPERTIES.

Vanuzia R. F. Ferreira[†], Barbara S. Bellete[†], Marisa Ionta[‡], Carolina G. Pressete[‡], Mário C. Guerreiro[†], Gislaine C. P. de Carvalho^{†1}, Eduardo M. Ramos[§], David L. Nelson[^], Maria das G. Cardoso^{†}.*

[†]Chemistry Department, Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil;

[‡]Department of Cell Biology, Federal University of Alfenas, Alfenas-MG, Brazil;

[§]Food Sciences Department, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, 37200-900, MG, Brazil.

[^]Postgraduate Program in Biofuels, Federal University of The Jequitinhonha and Mucuri Valleys, Diamantina-MG, Brazil.

***Corresponding Author**

Phone: +55 35 3829-1202 Fax: +55 35 3829-1271; E-mail: mcardoso@.ufla.br.

Cx. Postal 3037, 37.200.000 – Lavras-MG.

ABSTRACT

Eugenyl acetate and bis-eugenol were synthesized from commercial eugenol, and the influence of the chemical structure on the oxidative stability and antioxidant and cytotoxic activities of these compounds was evaluated. Eugenol was acetylated in acid and acetic anhydride to produce eugenyl acetate in 81% yield, and it was oxidized with ammonium hydroxide and a saturated solution of $K_3[Fe(CN)_6]$ to yield 57% of bis-eugenol. The products were characterized by FTIR and 1H NMR. Oxidative stability was evaluated by the Rancimat method, in which greater stability was observed for bis-eugenol. The induction time for oxidation of sunflower oil increased from 3.63 h to 10.36 h in the presence of this compound. The antioxidant activity measured by DPPH radical stabilization assays, thiobarbituric acid reactive species (TBARS and liposomes) and phosphomolybdenum complexation highlighted the importance of the number of phenolic hydroxyl groups and the presence of bulky substituents in positions close to the -OH group. Activities of eugenol and bis-eugenol were similar to the those of the antioxidant BHT in most assays. The structural modification did not contribute to the increase in the cytotoxicity of the products evaluated in CCD-1059Sk cell lines. Eugenol, eugenyl acetate and bis-eugenol can be useful as food preservatives, mainly because of their antioxidant properties.

KEYWORDS: *o*-Methoxyphenols; Dehydrodieugenol; 4-Allyl-2-methoxyphenyl acetate; Cell viability; Biological properties.

1 Introduction

Phenolic compounds comprise one of the most comprehensive and bioactive classes of secondary metabolites found in nature. Due to their variety of biological effects, these compounds have received much scientific and consumer attention. They are increasingly looking for natural sources of antioxidants and antimicrobials in response to consumer health and environmental concerns¹⁻³. Among the phenolic compounds, phenylpropanoid derivatives with the basic structure of guaiacol stand out, such as eugenol and its derivatives, which are known mainly for being potent antioxidants. They possess the ability to neutralize free radicals and protect lipid substrates^{4,5}. When added to foods, in addition to contributing to flavoring with 'smoky', 'roast' and 'phenolic' tones⁶, these compounds can delay the formation of toxic oxidation products and maintain nutritional quality, thereby prolonging the shelf life of products^{2,3,7}.

The antioxidant activity of eugenol is associated with the hydrogen donation sites in the molecule. Ferreira et al.⁷ observed that, in addition to the phenolic hydroxyl, the allylic hydrogen of eugenol has a low dissociation energy ($\delta\Delta H$). Candido Junior et al.⁸ reported that the benzyl-allyl, phenoxy and methoxy groups can donate hydrogens to stabilize free radicals with the formation of quinones, eugenol dimers or both^{9, 10}. Because of its antioxidant property, eugenol has been studied for application in foods, either in its free, emulsified form¹¹ or encapsulated with different biopolymers¹² in production of films and coatings¹³ and active packaging¹⁴ for the conservation of different fresh or processed food products.

Despite several studies suggesting the applicability of eugenol as an antioxidant in industry, its use remains limited by its high volatility, low solubility and stability and intense sensory characteristics that are often undesirable, among other factors^{11, 12, 15}. These

characteristics are closely related to the chemical structure of eugenol; however, studies have shown that eugenol derivatives have different biological properties that might or might not enable their applicability as an antioxidant^{16,17}. Despite the fact that the abundance and reactivity of eugenol make the molecule attractive in synthetic ventures¹⁸, the evaluation of the influence of small changes in the chemical structure of eugenol and the biological responses of its derivatives has not been extensively addressed and explored. The objectives of the present work were to obtain and characterize the synthetic derivatives, eugenyl acetate and bis-eugenol, from commercial eugenol and to evaluate the influence of chemical structure on oxidative stability in sunflower oil; in the antioxidant activity using different methods such as stabilization of free radicals, protection of lipid substrates and reducing power of metal ions; as well as to evaluate the cytotoxicity of the derivatives by cell viability using the cell line CCD-1059Sk (fibroblasts derived from normal skin).

2 Material and Methods

2.1 Chemicals and Reagents

Chemicals and solvents: eugenol (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany), acetic anhydride (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), glacial acetic acid (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), sodium hydroxide (Merck, Darmstadt, Germany), acetone (Synth, Diadema, SP, Brasil), ammonium hydroxide (êxodo científica, Hortolândia, SP, Brazil), potassium hexacyanoferrate (III) ($K_3[Fe(CN)_6]$) (Fischer chemical, Bishop Meadow Road, Loughborough, UK), hydrochloric acid (Synth, Diadema, SP, Brasil), hexane (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), ethyl acetate (Macron Chemicals, Campinas, SP, Brasil), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH-, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany), ethanol (Synth, Diadema, SP, Brasil), thiobarbituric acid (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany), potassium chloride (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil), ferrous sulfate ($FeSO_4$) (êxodo

científica, Hortolândia, SP, Brazil), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA – Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil), hydrogen peroxide (Audaz, São Paulo, Brazil), sodium dodecyl sulfate (SDS) (Cromato Produtos Químicos - CRQ, Diadema, SP, Brazil), butylated hydroxytoluene (BHT, Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brazil), soybean L- α -lecithin (Calbiochem, San Diego, USA), chloroform (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil), phosphate-buffered saline 0,01 pH 7.0 (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brazil), iron (III) chloride (Acros organics, New Jersey, USA), ascorbic acid (Synth, Diadema, SP, Brasil), sulfuric acid (Merck, Darmstadt, Germany), sodium phosphate (Cromoline, Diadema, SP, Brazil), ammonium molybdate (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, CA, USA), % fetal bovine serum (Vitrocell, Campinas, Brazil), and sulforhodamine B (SRB).

2.2 Synthesis of eugenyl acetate (4-Allyl-2-methoxyphenyl acetate)

The synthesis of eugenyl acetate from commercial eugenol was performed according to a modification of the method described by Wang et al.¹⁹. To a 50 mL round bottom flask were added eugenol (0.98 g, 6 mmol), acetic anhydride (2.04 g, 20 mmol) and acetic acid (2 mL). The mixture was refluxed with stirring in an oil bath (135 °C) for 1.5 h. After cooling to room temperature, a mixture of water and ice was added with stirring (10 min). The organic phase was separated in a separatory funnel and washed with distilled water, 10% aqueous sodium hydroxide solution and again with distilled water. The product was separated by centrifugation and stored away from light and heat.

2.3. The synthesis of bis-eugenol

The synthesis of bis-eugenol was based on a procedure reported by Guzmán et al.²⁰. In a 500 mL flask, 10.5 g (64 mmol) of eugenol was dissolved in 100 mL of acetone, 50 mL of water and 70 mL of 25 % NH₄OH. The mixture was magnetically stirred for 10 min until the

color changed to yellowish-green. To this mixture, a saturated aqueous solution of $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (21.1 g, 64 mmol) was added dropwise over a 5 h period. The alkalinity of the reaction medium was maintained by the addition of 70 mL of 25% NH_4OH , and the mixture was stirred overnight. The solution was neutralized (pH 7) by adding HCl (1 M) at room temperature. The solid product obtained was filtered, washed three times with distilled water and then dried in an oven at 60 °C for further purification by recrystallization from aqueous ethanol. The crystals were filtered, dried (60 °C) and stored away from light, heat and moisture.

2.4 Chemical Characterization

Eugenol, eugenyl acetate and bis-eugenol were subjected to spectroscopic analysis for the identification of organic compounds.

2.4.1 Infrared spectra

Eugenyl acetate and bis-eugenol were analyzed for changes in functional groups in an infrared spectrophotometer (% transmittance) by Fourier transform (FTIR) (Shimadzu FTIR model-8201 A) using KBr cells for liquids and ATR, respectively. The spectral region ranged from 4000 to 400 cm^{-1} with a resolution of 4 cm and 32 scans. The spectra obtained were compared with that of eugenol.

2.4.2 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry

The ^1H NMR spectra were obtained on a Bruker AscendTM Nuclear Magnetic Resonance Instrument at 11.75 Tesla (500 MHz for the hydrogen frequency), using CDCl_3 as the deuterated solvent and tetramethylsilane (TMS) as the internal standard. The software used to process the spectra was the ACD/Labs NMR processor. Chemical shifts were expressed in δ (ppm) and coupling constants were given in Hertz (Hz).

2.5 Oxidative Stability

Oxidative stability was evaluated according to the method described by Gortzi et al.²¹ using 873 Professional Rancimat Biodiesel (Metrohm™). The conductivity of samples at different concentrations (0.05, 0.1, 1.0 and 2.5%) was measured in sunflower oil at 110 °C at an air flow of 10 L h⁻¹. Sunflower oil without the addition of samples was used as a control. The induction period was defined as the time corresponding to the inflection point of the conductivity curve (calculated by the equipment software) versus time and was used to determine the oxidative stability of the samples.

2.6 *In vitro* Antioxidant Activity

The *in vitro* antioxidant activity was evaluated by means of colorimetric assays of eugenol and its derivatives, in increasing concentrations from 50 to 2000 µg L⁻¹ in ethanol.

2.6.1 Stabilization of DPPH radical

The evaluation of antioxidant capacity through the stabilization of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals was performed according to the method described by Ferreira et al.⁷ with the following modifications: In test tubes, 3.7 mL of ethanolic DPPH solution (40 mg L⁻¹) and 300 µL of sample diluted in ethanol at concentrations from 1 to 500 µg mL⁻¹ were incubated for 60 min in the dark. Ethanol was used as a negative control, and the blank was prepared from 3.7 mL of ethanol and 300 µL of sample at the highest concentration. After incubation, readings were taken at 515 nm. The assay was performed in triplicate, and the antioxidant BHT was used as a positive control. The percentage of antioxidant activity (% AA) was measured by Equation 1. And the IC₅₀ was determined from the equation for the curve of the concentration versus % AA.

$$\% AA = 1 - \frac{A_{amostra}}{A_{controle}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

where: A_{sample} is the absorbance of the solution containing all the reagents, and A_{control} is the absorbance of the control.

2.6.2 Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS)

The capacity of the antioxidant to inhibit lipid peroxidation and, consequently, the formation of malonaldehyde, was determined by the TBARS assay according to the method described by Bounatirou et al.²². An emulsion containing 10 % (m/v) egg yolk in KCl (1.15 %) was used as a lipid source. A 500 μL aliquot of this solution was incubated with 100 μL of the samples diluted in ethanol at concentrations of 50 to 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$, 100 μL of 0.25 mM FeSO_4 /0.32 mM EDTA, and 100 μL of 0.017 M H_2O_2 at 50 °C for 30 min. In sequence, 1.5 mL of acetic acid (20%) and 1.5 mL of thiobarbituric acid (0.8 % in 1.1 % SDS) were added to the mixture, followed by a second incubation at 95 °C for 60 min. After cooling to room temperature, 1.5 mL of butanol was added, followed by stirring and centrifugation for 5 min at 3000 g. The absorbance was measured at 532 nm. In the negative control, the samples were replaced by ethanol. The antioxidant BHT was used as a positive control, and the entire assay was performed in triplicate. The percentage of antioxidant activity and the IC_{50} were calculated as described in item 2.6.1.

2.6.3 Liposomes

Antioxidant evaluation by liposome assay was accomplished according to a modification of the method described by Boulanouar et al.²³. A liposome solution was prepared using 0.4 g of lectin in 80 mL of chloroform. Forty grams of glass beads were added to the mixture. The system was submitted to rotary evaporation at 40 °C for 30 min to remove the chloroform, followed by 30 s under nitrogen flow and complete drying for 2 h under

vacuum. The liposomes were suspended with 80 mL of 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0), and the suspension was stirred for 30 min, filtered and stored at 4 °C until analysis. A combination of 500 µL of the liposome suspension, 25 µL of samples at different concentrations (10 to 2000 µg mL⁻¹), 100 µL of 6 mM FeCl₃ and 50 µL of 10 mM ascorbic acid was added to test tubes, followed by 1.5 mL of thiobarbituric acid (0.6 % in 1.1% SDS), and the mixture was incubated at 95 °C for 60 min. The tubes were cooled to room temperature, and the absorbance was measured at 532 nm. In the negative control, the samples were replaced by ethanol, the antioxidant BHT was used as a positive control, and the entire assay was performed in triplicate. The percentage of antioxidant activity and the IC₅₀ were measured as described in item 2.6.1.

2.6.4 Complexation of phosphomolybdenum

Ethanol dilutions (50 µL) of eugenol and its derivatives were added to test tubes at concentrations from 1 to 500 µg mL⁻¹, followed by 2000 µL of the ammonium phosphomolybdate complex solution (10% sulfuric acid, 28 mmol L⁻¹ sodium phosphate and 4 mmol L⁻¹ ammonium molybdate). The tubes were closed, shaken and placed in a water bath at 95 °C for 60 minutes. After cooling, readings were performed at 695 nm²⁴. BHT was used as a positive control, and the results were expressed as absorbance versus concentration.

2.7 Cell Viability

The CCD-1059Sk cell line (fibroblasts derived from normal skin), purchased from the Rio de Janeiro cell bank, were used in this study for assessing cytotoxic profiles of the eugenyl acetate and bis-eugenol. The cell cultures were maintained in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, CA, USA) supplemented with 10 % fetal bovine serum (Vitrocell, Campinas, Brazil). Cells were grown in a humidified atmosphere of 95 % air and 5 % CO₂

at 37 °C. Cell viability was assessed by sulforhodamine B (SRB) assay. The cells were seeded into 96-well plates at density of 1×10^4 cells per well. After attachment (24 h), the cells were treated for 72 h with different samples in a concentration range of 50-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cell monolayers were fixed with 10 % (wt/vol) trichloroacetic acid at 4 °C for 1 h and stained with SRB (0.4 %) for 30 min. Next, the samples were washed repeatedly with 1 % (vol/vol) acetic acid to remove unbound SRB. The protein-bound dye was dissolved in 10 mM Tris base solution for optical density (OD) determination at 540 nm with reference of 690, using a microplate reader (Biochrom® Anthos Zenyth 200) at 490 nm. Experiments were conducted in triplicate, and data presented are corresponding to three independent experiments²⁵.

2.8 Statistical Analysis

The experimental design used was completely randomized (CRD) with three replications. The statistical program used was SISVAR²⁶. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) to verify the treatments with eugenol and its derivatives on the results of oxidative stability and antioxidant activities. The means were compared by the Scott-Knott test at the 5% probability level. Cytotoxicity and IC_{50} results were subjected to analysis of variance (ANOVA) by Tukey's post-test (Prism 5.00, GraphPad Software, Inc), where differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1 Synthesis and chemical characterization of eugenyl acetate and bis-eugenol

Eugenyl acetate was synthesized by selective acylation of eugenol with acetic anhydride and acetic acid, yielding an opaque yellow oil with a mild woody odor of cloves in an 81 % yield. The dimerization of eugenol was achieved by its oxidation in acetone and ammonium

hydroxide and a saturated solution of $K_3[Fe(CN)_6]$, leading to the formation of 57 % of bis-eugenol, a bright pale pink solid. The infrared spectra obtained (Figure 1 A and B) are characteristic of aromatic compounds derived from guaiacol, with elongation bands characteristic of the O-H bond ($\sim 3468\text{ cm}^{-1}$), and the C-O bond of the hydroxyl-bound carbon ($\sim 1268\text{ cm}^{-1}$); bands at ~ 1513 and $\sim 1030\text{ cm}^{-1}$ characteristic of the aromatic ring and ether bonds, respectively. C-C vibration bands of aromatic rings ($\sim 1630\text{ cm}^{-1}$ and $\sim 1604\text{ cm}^{-1}$ and $\sim 1508\text{ cm}^{-1}$) were observed^{27,28}. Attenuation of the band in the region of axial stretching of -OH groups at $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ can be seen in the spectrum of eugenyl acetate spectrum (Fig. 1A), and the appearance of an intense band of ester carbonyl groups at 1762 cm^{-1} confirms that only the acyl group was added to the eugenol molecule^{27,29,30}. On the other hand, a shift of the broad axial deformation band of (-OH) to the region of $3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, characteristic of polymeric association and dimer formation³¹ can be seen in the infrared spectrum obtained for bis-eugenol (Fig. 1B). The confirmation of the eugenol dimerization reaction can be seen in the appearance of a low intensity band characteristic of tetrasubstituted aromatics at 870 cm^{-1} , in the attenuation of the angular absorption bands outside the -CH plane in ortho positions in the region from $800\text{ to }600\text{ cm}^{-1}$ ^{29,31}, and in the disappearance of the intense peak at 1511 cm^{-1} , that provide unique spectral confirmation of in the identification of eugenol, according to Tarhan³².

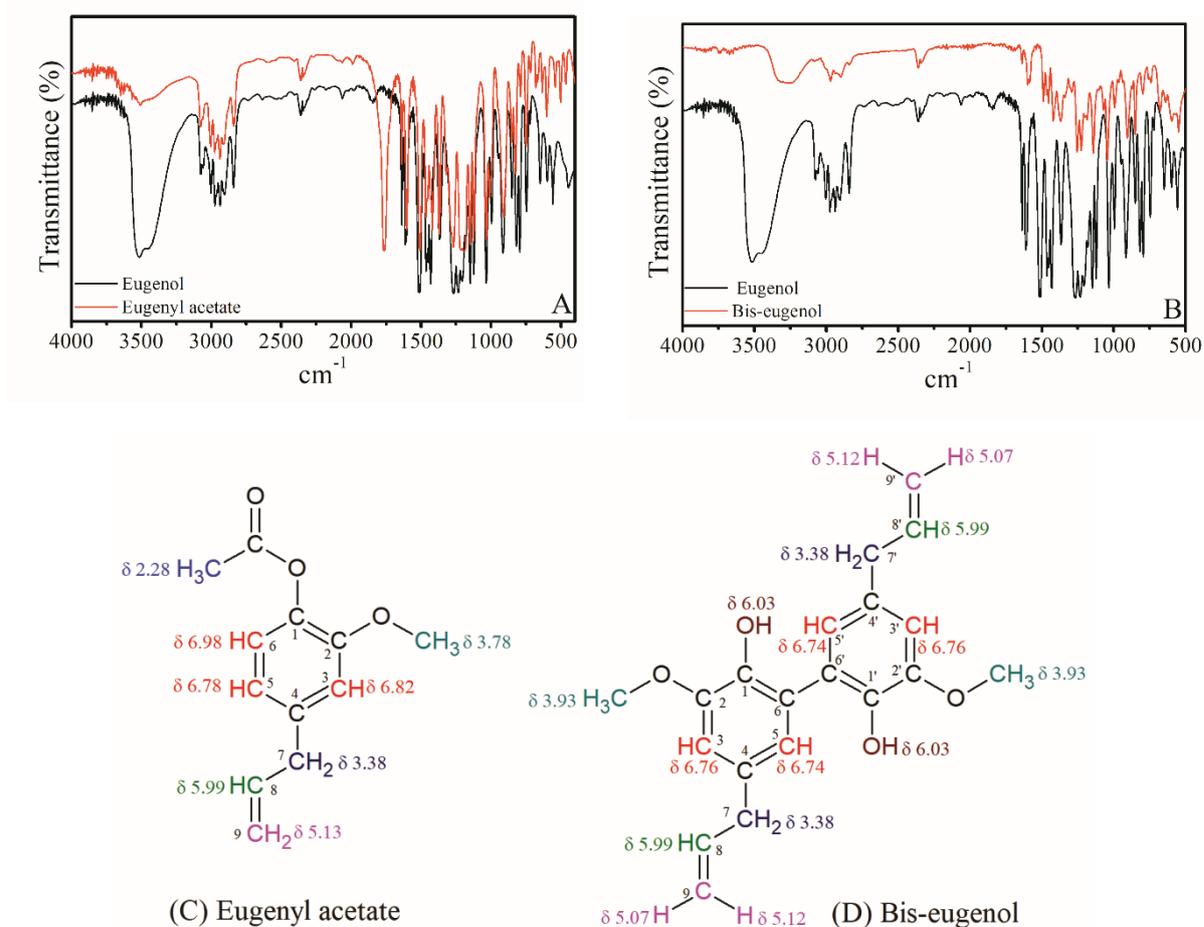


Figure 1. Spectrum in the infrared region (4000 to 500 cm^{-1}). Superposition of eugenol and eugenyl acetate (A) and bis-eugenol (B) bands. Chemical structure of eugenyl acetate (C) and bis-eugenol (D) with chemical shifts obtained by ^1H NMR.

Signals characteristic of a trisubstituted aromatic ring at δH 6.98 (1H, d, $J=7.9$ Hz), δH 6.82 (1H, d, $J=1.8$ Hz) and 6.78 (1H, dd, $J=7.9$ and 1.8 Hz), referring to H-6, H-3 and H-5, respectively (Figure 1C), are listed for the ^1H NMR analysis of eugenyl acetate. The signal associated with vinylic hydrogen H-8 at δH 5.99 (1H, ddt, $J=17.0$, 10.1 and 6.7 Hz) is characteristic of the allylic group, whereas δH 5.11-5.11 (2H, m) was associated with terminal vinyl hydrogens H-9, and δH 3.38 (2H, d, $J=6.7$ Hz) was associated with the allylic hydrogens of the molecule. The singlet in δH 3.78 (3H, s) refers to methyl groups linked to heteroatoms present in the aromatic ring, whereas the singlet in δH 2.28 (3H, s) refers to a methyl groups linked to a carbonyl and confirms the acetylation of the phenolic OH group.

The synthesis of bis-eugenol was confirmed by means of the ^1H NMR spectrum, in which signals characteristic of a tetrasubstituted aromatic ring, with signals at δH 6.76 (2H, d, $J=2.1$ Hz) and 6.74 (2H, d, $J=2.1$ Hz), referring to H-3 and H-5, which couple in meta with each other (Figure 1 D), can be seen. The H-6 signal of the aromatic ring is not observed in this spectrum because there is a bond between the two rings at this position. For this molecule, only 1 singlet was observed in 3.93 (6H, s) referring to the methoxyl of each aromatic ring of the dimer. The signal at δH 5.99 (2H, ddt, $J=16.9, 10.0, \text{ and } 6.7$ Hz (x2)) refers to the vinyl H8. It appears superimposed with a singlet δH 6.03 (2H, s) and corresponds to the presence of a hydrogen bound to the heteroatom, suggesting the presence of the hydroxyl of the aromatic ring at C1/C1'. The signals at δH 5.12 (2H, dq, $J= 16.9, 1.7$ (x3) Hz) and δH 5.07 (2H, dq, $J= 10.0, 1.4$ (x3) Hz) refer to the terminal vinyl hydrogens, and the first signal couples in trans with the H8, whereas the second signal couples in cis. Finally, the δH 3.38 (4H, d, $J=6.7$ Hz) signal refers to the allylic hydrogens of each dimer. Chemical shifts, as well as integrals, multiplicities and coupling constants are in agreement with values found in the literature for both compounds synthesized^{20, 30, 31, 33}.

3.2 Oxidative Stability

The graphs of conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$) versus time (hour) for eugenol, eugenyl acetate and bis-eugenol at concentrations of 0.05 % (A), 0.1 % (B), 1 % (C) and 2.5 % (D) are presented in Figure 2. The conductivity of the treatments and the control increased slowly and almost linearly with time at all the concentrations evaluated until the accelerated oxidation stage, where a sudden and sharp increase, called induction time (IT), occurred. This period was influenced by the increase in concentration, mainly for bis-eugenol (Fig. 2 C and D). Little variation in IT was observed for eugenol, and there was no variation with the addition of higher concentrations of eugenyl acetate (Table 1). At low concentrations, the conductivity (Fig 2 A and B) and the induction time of the treatments (Table 1) are equal ($p > 0.05$) to

that of pure sunflower oil. However, the IT of eugenol and bis-eugenol increased significantly ($p < 0.05$) with increasing concentration. For example, the addition of 2.5% eugenol and bis-eugenol increased the induction time from 3.63 h for pure sunflower oil to 4.55 and 10.36 h, respectively.

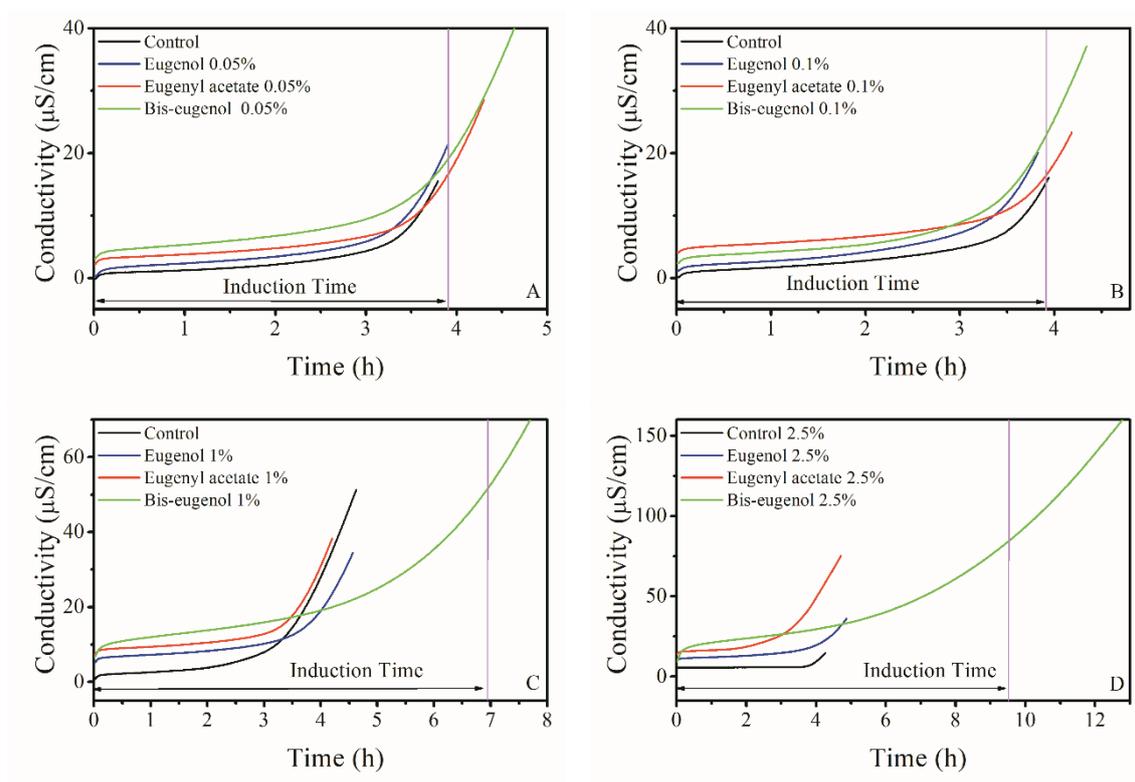


Figure 2. Induction time (Rancimat method) of eugenol, eugenyl acetate and bis-eugenol (A-0.05, B-0.1, C-1 and D-2.5 %) and control in sunflower oil determination of conductivity versus time at 110 °C.

The longer the time necessary for advanced oxidation, with the formation of volatile acids, the greater the stability of the evaluated compound^{34, 35}. Among the samples, the longest induction time was observed for bis-eugenol, followed by those of eugenol and eugenyl acetate. Because the oxidative stability is closely related to the molecular structure of the samples, it is observed that the eugenyl acetate molecule was less stable than eugenol, this is probably due to the presence of the $-OCOCH_3$ group, which is more easily cleaved than the $-OH$ group. And because the primary oxidation products, commonly formed and detected by the Rancimat method, are volatile acids such as formic and acetic acid, the induction time of

eugenyl acetate is shorter than that of eugenol. However, bis-eugenol has been observed to have greater oxidative stability, likely due to the higher aromatic and phenolic content of the molecule^{36,37}.

Table 1. Induction time (h) of autooxidation for sunflower oil after addition eugenol, eugenyl acetate and bis-eugenol at increasing concentrations.

Sample	Induction time (hours)			
	0.05 %	0.1 %	1 %	2.5 %
Control	3.45 ± 0.01aA	3.53 ± 0.06aA	3.38 ± 0.01aA	3.63 ± 0.37aA
Eugenol	3.53 ± 0.01aA	3.55 ± 0.08aA	3.97 ± 0.04bB	4.55 ± 0.15bC
Eugenyl acetate	3.64 ± 0.30aA	3.63 ± 0.01aA	3.60 ± 0.04aA	3.55 ± 0.28aA
Biseugenol	3.90 ± 0.11aA	3.82 ± 0.01aA	6.99 ± 0.33cB	10.36 ± 0,01cC

Control: pure sunflower oil. The means followed by the same lowercase letters in the rows and uppercase letters in the columns do not differ from one another by the Scott-Knott test at the 5% probability level.

The Rancimat method can also be used to measure the activity of an antioxidant in delaying the lipid oxidation of vegetable fats and oils under aeration conditions and elevated temperatures^{35,36}. The increase in the induction time of vegetable oil after addition of 1 and 2.5% eugenol and bis-eugenol indicates a longer shelf life of sunflower oil in the formation of volatiles typical of rancid oils and fats³⁸. Rajamohan et al.³⁷ evaluated the oxidative stability and behavior of engines operated by diesel/biodiesel mixtures from *Prosopis juliflora* in the presence of a synthetic antioxidant and observed that the phenolic group confers high oxidative stability because it provides easily dissociable hydrogen atoms that can prevent the free radical initiation process, thereby terminating the propagation reaction and delaying the rate of oxidation of biodiesel.

Thus, the presence of two phenolic groups in the bis-eugenol molecule favors a greater antioxidant and protective activity for sunflower oil. The reason for the poor performance of eugenyl acetate compared to the other antioxidants is precisely the lack of the phenolic hydroxyl group. It was replaced by the -OCOCH₃ group, which does not efficiently contribute to the scavenging of free radicals.

3.3 Antioxidant Activity

The evaluation of the antioxidant activity of eugenol, eugenyl acetate and bis-eugenol through different in vitro assays is presented in Figure 3. In the DPPH, TBARS and Liposome assays (Figure 3A, B and C, respectively), the activity of the samples was dose dependent with an exponential behavior, with the exception of eugenyl acetate in the DPPH test (Figure 3A). For the phosphomolybdenum complexation assay, a linear and dose-dependent behavior was observed (Figure 3 D).

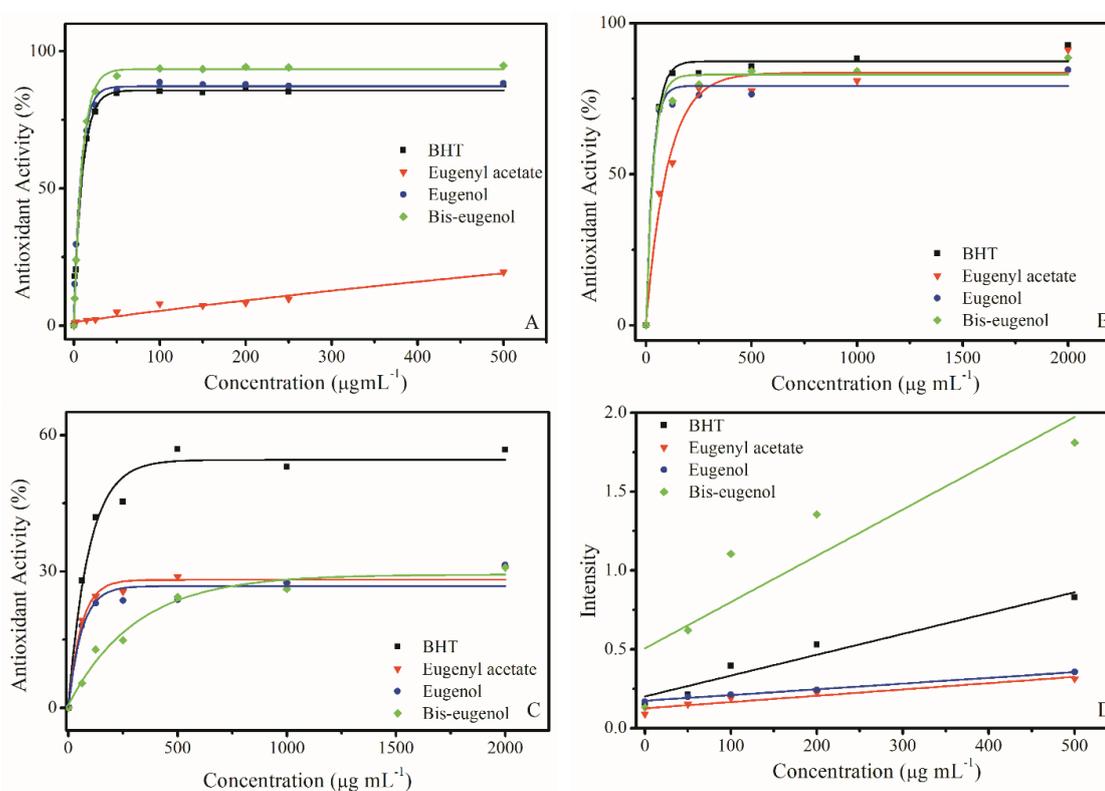


Figure 3. Antioxidant and dose-dependent effect of BHT, eugenol and its derivatives in assays of (A) stabilization of DPPH radicals, (B) thiobarbituric acid reactive substances-TBARS, (C) liposomes and (D) phosphomolybdenum complexation.

The IC₅₀ values obtained for eugenol, eugenyl acetate and bis-eugenol are shown in Table 2. According to Talón et al.³⁹, the lower the IC₅₀ values, the higher the antioxidant activity of the sample tested. Significant activity, equal to the activity of the antioxidant BHT ($p < 0.05$) in the DPPH radical scavenging and lipid substrate protection (TBARS)

assays, with low IC₅₀ values, was observed for eugenol and bis-eugenol. A low DPPH radical-scavenging capacity and a moderate protective activity against lipid substrates in the TBARS assay were observed for eugenyl acetate. These results are consistent with those found by Hidalgo et al.⁴⁰ and reviewed by Candido Júnior et al.⁸, who also reported the loss of antioxidant activity in the DPPH assay after eugenol acetylation. Candido Junior et al.⁸ show that the hydrogen donation of the functional groups of eugenol and its derivatives against different free radicals follows the trend benzyl-allyl ~ allyl > phenoxy > methoxy > acetyl. This order is related to the dispersion of electron density by the structure, the stability of the radical formed after the donation of hydrogen atoms, and the ability to form quinones. The authors emphasize that the negative result for the antioxidant activity of eugenyl acetate is due to the structural inability to form *p*-quinomethanes in the DPPH assay. The results obtained in the TBARS assay for eugenyl acetate highlight the importance of the allylic group in the inhibition of lipid peroxidation. The acetate group (- OCOCH₃) is an electron density scavenger and can help to lower the energy of the resonance hybrid formed after donation of the allylic hydrogen atom. Eugenyl acetate could also act as a preventive antioxidant by inhibiting the initiation reactions through the chelation of metals or scavenging of hydroxyl radicals because it bears groups (- OCOCH₃ and -OCH₃) that can act as polydentate ligands^{41, 42}.

Table 2. IC₅₀ values from the DPPH, TBARS, liposomes and slope assays for the phosphomolybdenum complexing assay obtained for BHT, eugenol, eugenyl acetate and bis-eugenol.

Sample	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)			Slope
	DPPH	TBARS	Liposomes	Phosphomolybdenum
BHT	8.18±0.12 ^a	32.94±1.76 ^a	212.59±16.95	0.2200 ± 0.03 c
Eugenol	6.73±0.26 ^a	28.78±0.29 ^a	> 2000	0.1671 ± 0.01 b
Eugenyl acetate	2505.25±19.04 ^b	98.35±4.95 ^b	> 2000	0.1323 ± 0.005 a
Bis-eugenol	7.17±0.04 ^a	31.55±0.12 ^a	> 2000	0.5144 ± 0.01 d

The means followed by the same lowercase letters do not differ from one another by the Scott-Knott test at the 5% probability level.

The *in vitro* antioxidant activity of eugenol is reported in several studies to be similar to or greater than the activity of BHT. This result is due to the energetically favorable sites for hydrogen donation in this molecule^{7, 8, 10, 17} that facilitate the inactivation of free radicals or compete with free radicals to prevent the propagation of oxidative chain reactions³⁵. Despite its high antioxidant activity, bis-eugenol was initially developed as a more potent antioxidant than eugenol^{43, 44}. However, under the conditions and at the concentrations evaluated, the antioxidant behavior observed for bis-eugenol was equal ($P < 0.05$) to the behavior of eugenol, with the exception of the phosphomolybdenum complexing assay. The results obtained by Ogata et al.⁴⁴ were different. They observed a five-fold greater radical scavenging effect for bis-eugenol than for eugenol.

In the liposome assay, only BHT proved to be an effective antioxidant, despite having a higher IC_{50} value. Soy lectin liposome models are used in several studies for eugenol encapsulation, which usually results in a decrease in antioxidant activity. This fact explains the lack of antioxidant activity for eugenol and its derivatives in this assay, because eugenol and its derivatives were probably incorporated into liposomes^{39, 45}.

In the molybdenum assay, a phosphate and Mo(V) complex is formed as a reducing agent produces Mo(V) from Mo(VI). The reaction is confirmed by the increase in absorbance at 695 nm²⁴. The slope of the absorbance versus concentration curves provides a comparative measure of the total antioxidant capacity (fat-soluble and water-soluble) of the samples. Thus, the greater the slope, the greater the antioxidant potential. There were significant differences ($P < 0.05$) between the slopes obtained for BHT and those for eugenol and their derivatives. The antioxidant activity by the phosphomolybdenum complexing assay decreases in the order bis-eugenol > BHT > eugenol > eugenyl acetate. The results underscore not only the importance of the number of phenolic hydroxyl groups, but also the presence of bulky substituents in positions adjacent to the hydroxyl group^{17, 46, 47}.

3.4 Cell viability

Eugenol is considered to be safe by the Food and Drug Administration (FDA), and it is not a mutagen or carcinogen^{48,49}. The cytotoxic profiles of eugenyl acetate and bis-eugenol were evaluated on CCD-1059Sk cells (fibroblasts derived from normal skin). A slightly reduction in cell viability rate was observed only in samples treated with high concentrations ($500^{-1}, 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$), indicating very low cytotoxicity of these substances on CCD-1059Sk cells (Figure 4).

Eugenyl acetate is considered to be a safe flavoring substance by the Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO) and the European Food Safety Authority (EFSA)^{50,51} for use in food products. According to experts from the Flavor Extract Manufacturers' Association⁵², ethyl esters are hydrolyzed to eugenol and the corresponding carboxylic acid and are metabolized in the liver and excreted in the urine.

Bis-eugenol synthesized by the oxidation of eugenol has been reported to be less cytotoxic than eugenol in cell culture tests^{43,53}. According to Murakami et al.⁴³, the eugenol dimer is an efficient inhibitor of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory cytokine expression in macrophages, without cytotoxicity. The authors also argue that dimerization reduces the pro-oxidant and allergenic effects of eugenol when used in high concentrations. A variety of studies have shown that essential oil components and synthetic derivatives can be useful in the food, pharmacological and nutritional fields⁵⁴⁻⁵⁵. Therefore, the determination of the cytotoxic profile of synthetic products derived from natural ones is useful to establish the safe dose for consumption.

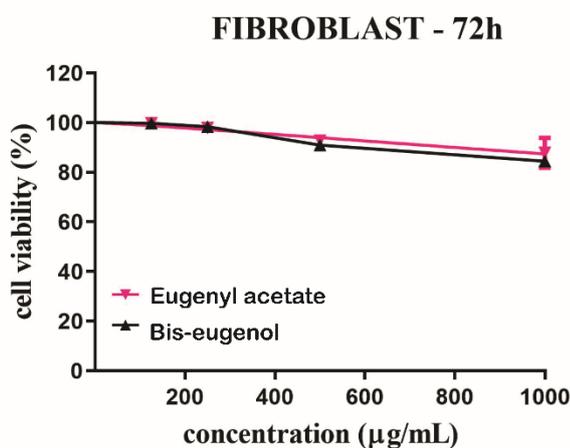


Figure 4: Cell viability was determined by SRB assay. CCD-1059Sk cells treated for 72 hours with eugenyl acetate and bis-eugenol at different concentrations.

Conclusion

Eugenyl acetate and bis-eugenol were synthesized from eugenol in 81 and 57% yields, respectively. The FTIR analysis showed carbonyl groups of esters at 2500 cm^{-1} (eugenyl acetate) and the presence of all absorption bands of the eugenol spectrum attenuated in the bis-eugenol spectrum. The molecular structure of the synthesized compounds was confirmed by $^1\text{H NMR}$, with signals characteristic of an aromatic ring trisubstituted with methyl groups linked to carbonyls (eugenyl acetate) and a tetrasubstituted aromatic ring, with symmetry and double integration for all ^1H signals in bis-eugenol. Greater oxidative stability and greater ability to protect sunflower oil against oxidation was observed for bis-eugenol than for eugenol and eugenyl acetate. Eugenyl acetate had a lower antioxidant activity, and the dimerization of eugenol potentiated the activity by the phosphomolybdenum complexation method. The structural changes did not contribute to the increase in the cytotoxicity of eugenyl acetate and bis-eugenol, which can be said to be useful as food preservatives, mainly because of their antioxidant properties.

Funding Sources

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, and by the [Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)], the [Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)].

Notes

All data generated or analysed during this study are included in this article.

Conflicts of interest

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG); the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance code 001. The authors thank the Central of Analysis and Chemical Prospecting of the Federal University of Lavras and the Analytical Center of the Natural Products Laboratory of the Department of Chemistry of the Federal University of Mato Grosso, Brazil.

REFERENCES

1. Ampofo, J. O., & Ngadi, M. (2021). Stimulation of the phenylpropanoid pathway and antioxidant capacities by biotic and abiotic elicitation strategies in common bean (*Phaseolus vulgaris*) sprouts. *Process Biochemistry*, 100, 98-106. (Ampofo and Ngadi, 2021)
2. Ávila-Román, J., Soliz-Rueda, J. R., Bravo, F. I., Aragonès, G., Suárez, M., Arola-Arnal, A., ... & Muguerza, B. (2021). Phenolic compounds and biological rhythms: Who takes the lead?. *Trends in Food Science & Technology*. (Ávila-Román et al., 2021)

3. Sabaghi, M., Tavasoli, S., Jamali, S. N., Katouzian, I., & Faridi Esfanjani, A. (2022). The Pros and Cons of Incorporating Bioactive Compounds Within Food Networks and Food Contact Materials: a Review. *Food and Bioprocess Technology*, 1-34. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02837-w>.
4. Rutkowska, M., Balcerczak, E., Świechowski, R., Dubicka, M., & Olszewska, M. A. (2020). Seasonal variation in phenylpropanoid biosynthesis and in vitro antioxidant activity of *Sorbus domestica* leaves: Harvesting time optimisation for medicinal application. *Industrial Crops and Products*, 156, 112858. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112858>.
5. Schranz, M., Lorber, K., Klos, K., Kerschbaumer, J., & Buettner, A. (2017). Influence of the chemical structure on the odor qualities and odor thresholds of guaiacol-derived odorants, part 1: alkylated, alkenylated and methoxylated derivatives. *Food chemistry*, 232, 808-819. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.070>.
6. Lan, Y. B., Xiang, X. F., Yang, W. X., Zhu, B. Q., Pu, H. T., & Duan, C. Q. (2020). Characterization of free and glycosidically bound volatile compounds, fatty acids, and amino acids in *Vitis davidii* Foex grape species native to China. *Food Science and Biotechnology*, 29(12), 1641-1653. <https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10068-020-00823-6>.
7. Ferreira, V. R. F., Brandao, R. M., Freitas, M. P., Saczk, A. A., Felix, F. S., Silla, J. M., ... & das Graças Cardoso, M. (2019). Colorimetric, electroanalytical and theoretical evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium aromaticum* L., *Origanum vulgare* L., *Mentha spicata* L. and *Eremanthus erythropappus* M. essential oils, and their major constituents. *New Journal of Chemistry*, 43(20), 7653-7662. 10.1039/C8NJ05893.
8. Candido Júnior, J. R., Romeiro, L. A. S., Marinho, E. S., Monteiro, N. D. K. V., & de Lima-Neto, P. (2022). Antioxidant activity of eugenol and its acetyl and nitroderivatives: the role of quinone intermediates—a DFT approach of DPPH test. *Journal of Molecular Modeling*, 28(5), 1-15. <https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00894-022-05120-z>.
9. Bortolomeazzi, R., Verardo, G., Liessi, A., & Callea, A. (2010). Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 118(2), 256-265. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.115>.
10. Yildiz, G., Aydogmus, Z., Cinar, M. E., Senkal, F., & Ozturk, T. (2017). Electrochemical oxidation mechanism of eugenol on graphene modified carbon paste

electrode and its analytical application to pharmaceutical analysis. *Talanta*, 173, 1-8.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.056>.

11. Bai, T., Li, J., Murtaza, A., Iqbal, A., Zhu, L., Zhang, J., ... & Hu, W. (2022).

Scavenging of ROS After Eugenol Treatment as Mechanism of Slowing Down Membrane Lipid Metabolism to Maintain the Surface Color of Fresh-Cut Yam. *Food and Bioprocess Technology*, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02833-0>.

12. Celebioglu, A., Yildiz, Z. I., & Uyar, T. (2018). Fabrication of electrospun eugenol/cyclodextrin inclusion complex nanofibrous webs for enhanced antioxidant property, water solubility, and high temperature stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(2), 457-466. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04312>

13. Watanabe, H., Takahashi, M., Kihara, H., & Yoshida, M. (2018). Biobased coatings based on eugenol derivatives. *ACS Applied Bio Materials*, 1(3), 808-813.

14. Wang, Y., Xia, Y., Zhang, P., Ye, L., Wu, L., & He, S. (2017). Physical characterization and pork packaging application of chitosan films incorporated with combined essential oils of cinnamon and ginger. *Food and Bioprocess Technology*, 10(3), 503-511. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1833-8>.

15. Wang, Q., Zhang, L., Ding, W., Zhang, D., Reed, K., & Zhang, B. (2020). Orthogonal optimization and physicochemical characterization of water-soluble gelatin-chitosan nanoparticles with encapsulated alcohol-soluble eugenol. *Food and Bioprocess Technology*, 13(6), 1024-1034. <https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11947-020-02448-3>

16. Bittencourt-Mernak, M. I., Pinheiro, N. M., da Silva, R. C., Ponci, V., Banzato, R., Pinheiro, A. J., ... & Prado, C. M. (2021). Effects of Eugenol and Dehydrodieugenol B from *Nectandra leucantha* against Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Experimental Acute Lung Inflammation. *Journal of Natural Products*, 84(8), 2282-2294.

<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00386>

17. Mastelic, J., Jerkovic, I., Blažević, I., Poljak-Blaži, M., Borović, S., Ivančić-Baće, I., ... & Müller, N. (2008). Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(11), 3989-3996. <https://doi.org/10.1021/jf073272v>.

18. Morales-Cerrada, R., Molina-Gutierrez, S., Lacroix-Desmazes, P., & Caillol, S. (2021). Eugenol, a promising building block for biobased polymers with cutting-edge properties. *Biomacromolecules*, 22(9), 3625-3648.

<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00837>.

19. Wang, X., Yi, M., Du, Q., Wu, A., & Xiao, R. (2012). Design and synthesis of novel pyrethroids containing eugenol moiety. *Medicinal Chemistry Research*, 21(10), 2827-2830. <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9809-8>.
20. Guzmán, D., Serra, A., Ramis, X., Fernández-Francos, X., & De la Flor, S. (2019). Fully renewable thermosets based on bis-eugenol prepared by thiol-click chemistry. *Reactive and Functional Polymers*, 136, 153-166. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2018.12.024>.
21. Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I., & Tsaknis, J. (2008). Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *European food research and technology*, 226(3), 583-590. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-007-0592-1>.
22. Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M. G., Faleiro, L., Rejeb, M. N., Neffati, M., ... & Pedro, L. G. (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food chemistry*, 105(1), 146-155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.059>
23. Boulanouar, B., Abdelaziz, G., Aazza, S., Gago, C., & Miguel, M. G. (2013). Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*, 46, 85-96. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.01.020>.
24. Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>.
25. Promega, C. 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Technical Bulletin, 2005.
26. Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e agrotecnologia*, 35, 1039-1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>.
27. de Oliveira, A. D. N., Leite Lima, E. T., de Oliveira, D. T., Angélica, R. S., de Aguiar Andrade, E. H., da Rocha Filho, G. N., ... & Santos do Nascimento, L. A. (2019). Acetylation of eugenol over 12-molybdophosphoric acid anchored in mesoporous silicate support synthesized from Flint Kaolin. *Materials*, 12(18), 2995. <https://doi.org/10.3390/ma12182995>.
28. Taraj, K., Andoni, A., Fatos, Y. L. L. I., Ariana, Y. L. L. I., Hoxha, R., Llupa, J., & Malollari, Í. (2019). Spectroscopic investigation of *Syzygium aromaticum* L. oil by water

distillation extraction. *Journal of International Environmental Application and Science*, 15(2), 122-126. <https://dergipark.org.tr/en/pub/jieas/issue/54918/705980>.

29. Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., Bryce, D. L. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 8th Revised ed. John Wiley & Sons., 2005.

30. Machado, J. R., Pereira, G. N., de Oliveira, P. D. S., Zenevycz, M. C., Lerin, L., de Oliveira, R. D. R. B., ... & de Oliveira, D. (2017). Synthesis of eugenyl acetate by immobilized lipase in a packed bed reactor and evaluation of its larvicidal activity. *Process Biochemistry*, 58, 114-119. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.031>.

31. Zhang, D., Jin, S., Wan, J., Wang, J., Li, Y., Jin, P., & Hu, D. (2021). A dieugenol-based epoxy monomer with high bio-based content, low viscosity and low flammability. *Materials Today Communications*, 29, 102846. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102846>.

32. Tarhan, İ. (2021). A robust method for simultaneous quantification of eugenol, eugenyl acetate, and β -caryophyllene in clove essential oil by vibrational spectroscopy. *Phytochemistry*, 191, 112928. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112928>.

33. Silva, M. J. A., Loss, R. A., Laroque, D. A., Lerin, L. A., Pereira, G. N., Thon, É., ... & Oliveira, D. (2015). Lipozyme TL IM as catalyst for the synthesis of eugenyl acetate in solvent-free acetylation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176(3), 782-795. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1611-5>.

34. da Cruz, R. M. S., da Silva, C., da Silva, E. A., Hegel, P., Barão, C. E., & Cardozo-Filho, L. (2022). Composition and oxidative stability of oils extracted from *Zophobas morio* and *Tenebrio molitor* using pressurized n-propane. *The Journal of Supercritical Fluids*, 181, 105504. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2021.105504>.

35. Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Sanches-Silva, A., & de Melo, N. R. (2018). Essential oils for food application: Natural substances with established biological activities. *Food and bioprocess technology*, 11(1), 43-71. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1948-6>.

36. Lama-Muñoz, A., Rubio-Senent, F., Bermúdez-Oria, A., Fernández-Prior, Á., Fernández-Bolaños, J., & Rodríguez-Gutiérrez, G. (2019). Synergistic effect of 3, 4-dihydroxyphenylglycol with hydroxytyrosol and α -tocopherol on the Rancimat oxidative stability of vegetable oils. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 51, 100-106. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.08.001>.

37. Rajamohan, S., Gopal, A. H., Muralidharan, K. R., Huang, Z., Paramasivam, B., Ayyasamy, T., ... & Hoang, A. T. (2022). Evaluation of oxidation stability and engine behaviors operated by *Prosopis juliflora* biodiesel/diesel fuel blends with presence of

synthetic antioxidant. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 52, 102086.
<https://doi.org/10.1016/j.seta.2022.102086>.

38. Bär, F., Hopf, H., Knorr, M., & Krahl, J. (2018). Rancimat and PetroOxy oxidation stability measurements of rapeseed oil methyl ester stabilized with hydrazides and antioxidants. *Fuel*, 232, 108-113. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.05.095>.

39. Talón, E., Vargas, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2019). Antioxidant starch-based films with encapsulated eugenol. Application to sunflower oil preservation. *LWT-Food Science and Technology*, 113, 108290.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108290>.

40. Hidalgo, M. E., de La Rosa, C., Carrasco, H., Cardona, W., Gallardo, C., Espinoza, L. (2009) Antioxidant capacity of eugenol derivatives. *Quim Nova* 32(6):1467–1470.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600020>.

41. Vega-Hernández, K., Antuch, M., Cuesta-Rubio, O., Núñez-Figueredo, Y., & Pardo-Andreu, G. L. (2017). Discerning the antioxidant mechanism of rapanone: A naturally occurring benzoquinone with iron complexing and radical scavenging activities. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 170, 134-147. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.02.019>.

42. Yang, A. H., Shi, X. Y., Li, X., Li, F. F., Zhang, Q. Q., Jiang, S. X., ... & Gao, H. L. (2014). Spectroscopic and electrochemical studies on the evaluation of the radical scavenging activities of luteolin by chelating iron. *Rsc Advances*, 4(48), 25227-25233. DOI 10.1039/C4RA01396D.

43. Murakami, Y., Shoji, M., Hirata, A., Tanaka, S., Yokoe, I., & Fujisawa, S. (2005). Dehydrodiisoeugenol, an isoeugenol dimer, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa B activation and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Archives of biochemistry and biophysics*, 434(2), 326-332. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.11.013>.

44. Ogata, M., Hoshi, M., Urano, S., & Endo, T. (2000). Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48(10), 1467-1469. <https://doi.org/10.1248/cpb.48.1467>.

45. Sebaaly, C., Haydar, S., & Greige-Gerges, H. (2022). Eugenol encapsulation into conventional liposomes and chitosan-coated liposomes: A comparative study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 67, 102942.

46. Guntero, V. A., Ferreti, C. A., Mancini, P. M., & Kneeteman, M. N. (2018). Synthesis and encapsulation of bis-eugenol in a mesoporous solid material: Enhancement of the antioxidant activity of a natural compound from Clove Oil.
<https://ria.utn.edu.ar/handle/20.500.12272/4109>.

47. Mathaiyan, M., Muthukrishnan, S., Eswaran, A., Mari, K. R., & Manogaran, P. (2021). The free radicals scavenging potential of methanol extract of seeds (Horse gram) of *Macrotyloma uniflorum*. *Materials Today: Proceedings*.
<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.907>.
48. da Silva Gündel, S., Dos Reis, T. R., Copetti, P. M., Favarin, F. R., Sagrillo, M. R., da Silva, A. S., ... & Ourique, A. F. (2019). Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity of nanoemulsions containing Mancozeb and Eugenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 207-215. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.023>.
49. FDA - Food and Drug Administration. In:
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=172.515>.
(Accessed Mar, 29, 2022).
50. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) WHO Technical Report Series, 934 (2005), pp. 7-16. In:
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43408/WHO_TRS_934_eng.pdf;jsessionid=0ED37AC453691B1BFB12EF0418A5933E?sequence=1. (Accessed Mar, 29, 2022).
51. EFSA (European Food Safety Authority) Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) EFSA J. (2011). In
<https://www.researchgate.net/scientific-contributions/EFSA-Panel-on-Additives-and-Products-or-Substances-used-in-Animal-Food-FEEDAP-2114968510>. (Accessed Mar, 29, 2022).
52. Flavor Extract Manufacturers' Association (FEMA). *Food technology*, Vol 19. N° 2 (Part 2), 1965. In <https://www.femaflavor.org/sites/default/files/GRAS3.pdf>. (Accessed Mar, 29, 2022).
53. Fujisawa, S., Okada, N., & Muraoka, E. (2001). Comparative effects of eugenol to bis-eugenol on oral mucous membranes. *Dental materials journal*, 20(3), 237-242.
<https://doi.org/10.4012/dmj.20.237>.
55. Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Chafer, M. (2011). Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 1-16. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12393-010-9031-3>
56. Ghabraie, M., Vu, K. D., Tata, L., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2016). Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 332-339.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.055>.

SUPPORTING INFORMATION

Journal of Natural Products

**SYNTHESIS OF EUGENOL DERIVATIVES: EVALUATION OF THE
STRUCTURAL INFLUENCE ON OXIDATIVE STABILITY, ANTIOXIDANT AND
CYTOTOXIC PROPERTIES.**

Figure S1. ^1H NMR spectrum of eugenol acetate (CDCl_3 , 500 MHz)

Figure S2. Expansion and coupling constant (J/ Hz) of ^1H NMR spectrum of eugenol acetate (CDCl_3 , 500 MHz)

Figure S3. Expansion (δH 5.0-7.1 ppm) of ^1H NMR spectrum of eugenol acetate (CDCl_3 , 500 MHz)

Figure S4. ^1H NMR spectrum of biseugenol (CDCl_3 , 500 MHz)

Figure S5. Expansion and coupling constant (J/ Hz) of ^1H NMR spectrum of bis-eugenol (CDCl_3 , 500 MHz)

Figure S6. Expansion (δH 4.8-7.0 ppm) of ^1H NMR spectrum of bis-eugenol (CDCl_3 , 500 MHz)

Eugenol Acetate: ^1H NMR (500MHz) δ 6.98 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H3), δ 6.82 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H5), δ 6.78 (1H, dd, $J=7.9$ e 1.8 Hz, H6), δ 3.38 (2H, d, $J=6.7$ Hz, H7), δ 5.99 (1H, ddt, $J=17.0$; 10.1 ; 6.7 , Hz, H8), δ 5.13 (2H, m, H9), δ 2.28 (3H, s, H11), δ 3.78 (3H, s, OCH₃)

Bis-eugenol: ^1H NMR (500MHz) δ 6.76 (2H, d, $J=2.1$ Hz, H3); δ 6.74 (2H, d, $J=2.1$ Hz, H5), δ 3.38 (4H, d, $J=6.7$ Hz, H7), δ 5.99 (2H, ddt, $J=16.9$; 10.1 ; 6.6 ; Hz, H8), δ 5.12 (2H, dq, $J=16.9$; 1.7 Hz, H9a), δ 5.07 (2H, dq, $J=10.0$; e 1.4 Hz, H9b), 3.93 (6H, s, OCH₃).

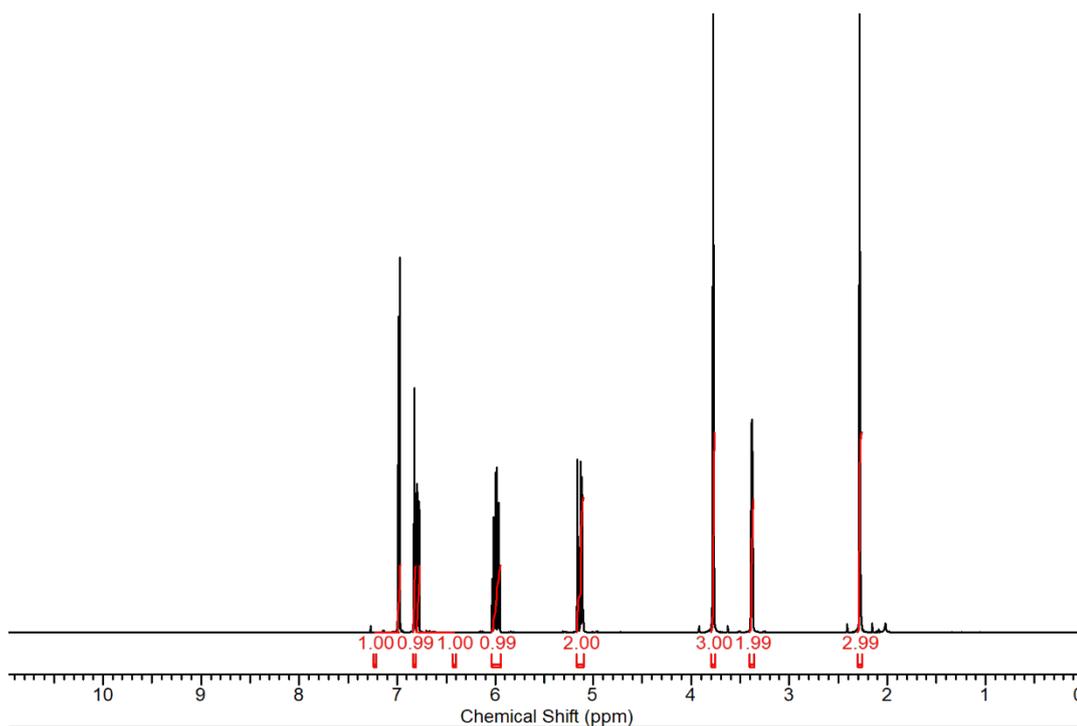


Figure S1. ^1H NMR spectrum of eugenol acetate (CDCl_3 , 500 MHz)

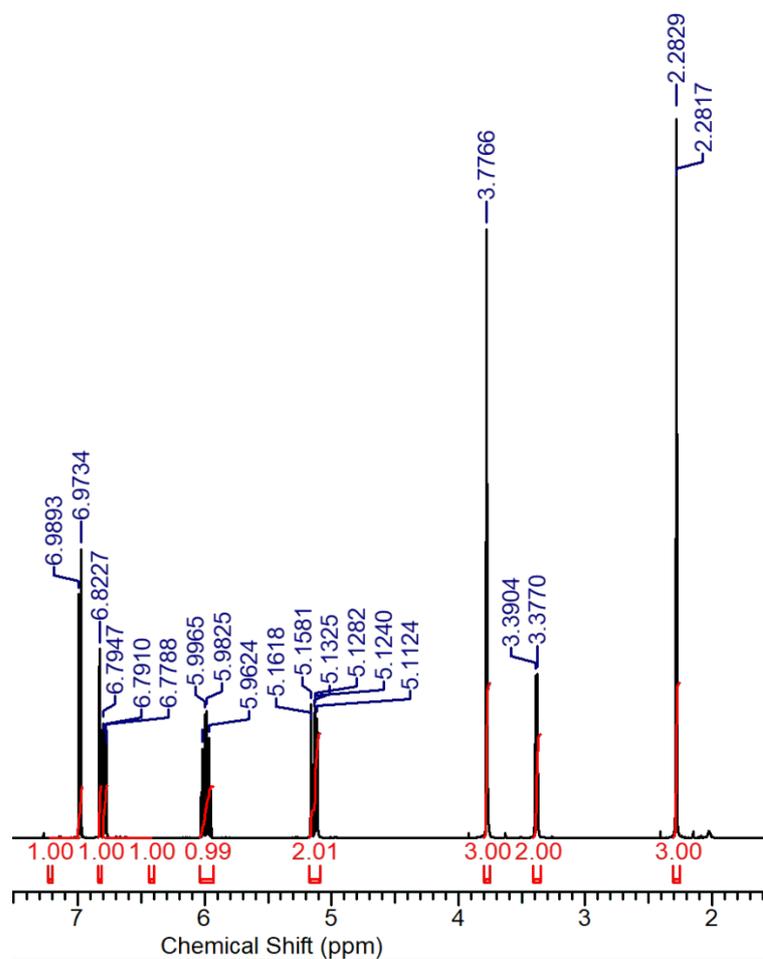


Figure S2. Expansion and coupling constant (J/Hz) of ^1H NMR spectrum of eugenol acetate (CDCl_3 , 500 MHz)

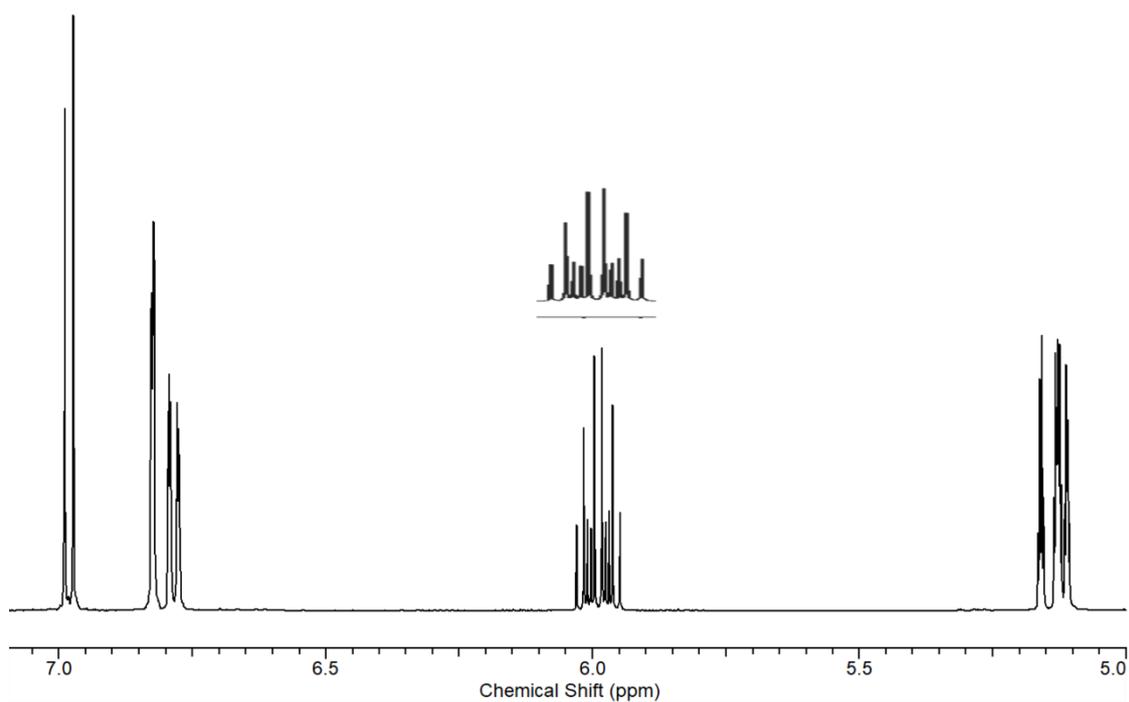


Figure S3. Expansion (δH 5.0-7.1 ppm) of ^1H NMR spectrum of eugenol acetate (CDCl_3 , 500 MHz)

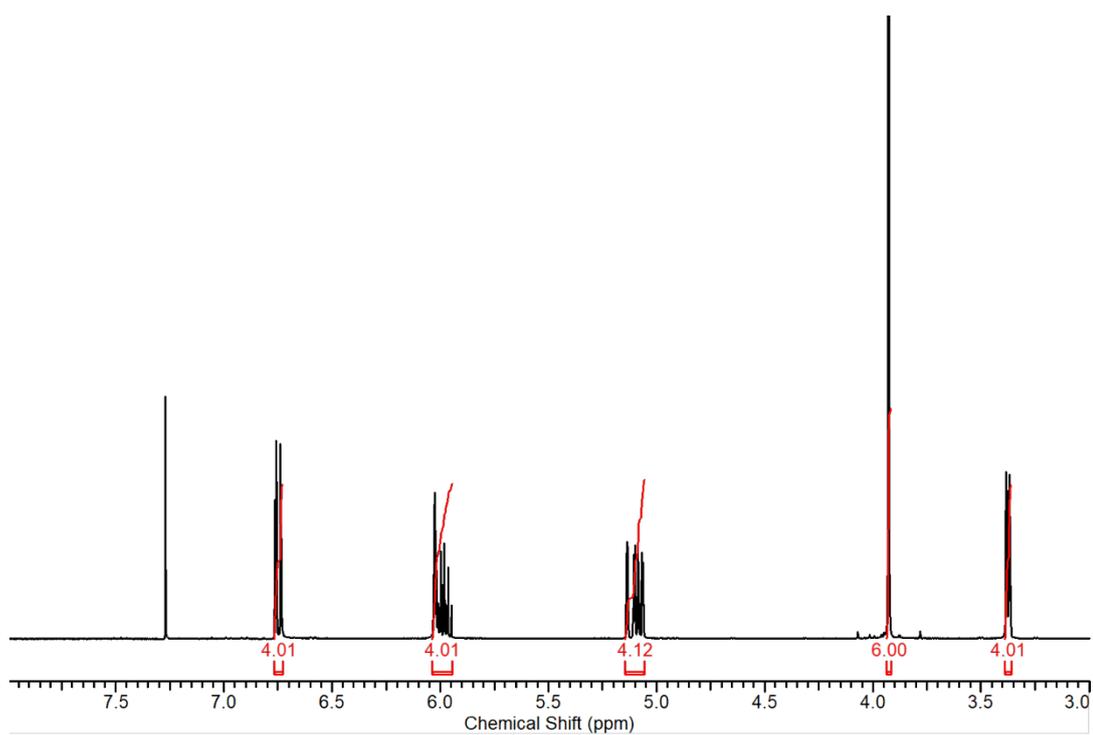


Figure S4. ^1H NMR spectrum of bis-eugenol (CDCl_3 , 500 MHz)

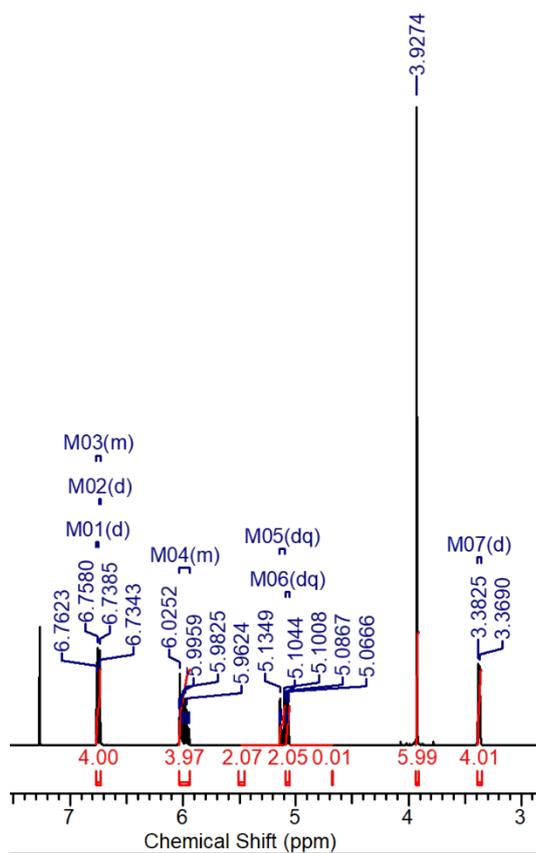


Figure S5. Expansion and coupling constant (J/Hz) of ^1H NMR spectrum of bis-eugenol (CDCl_3 , 500 MHz)

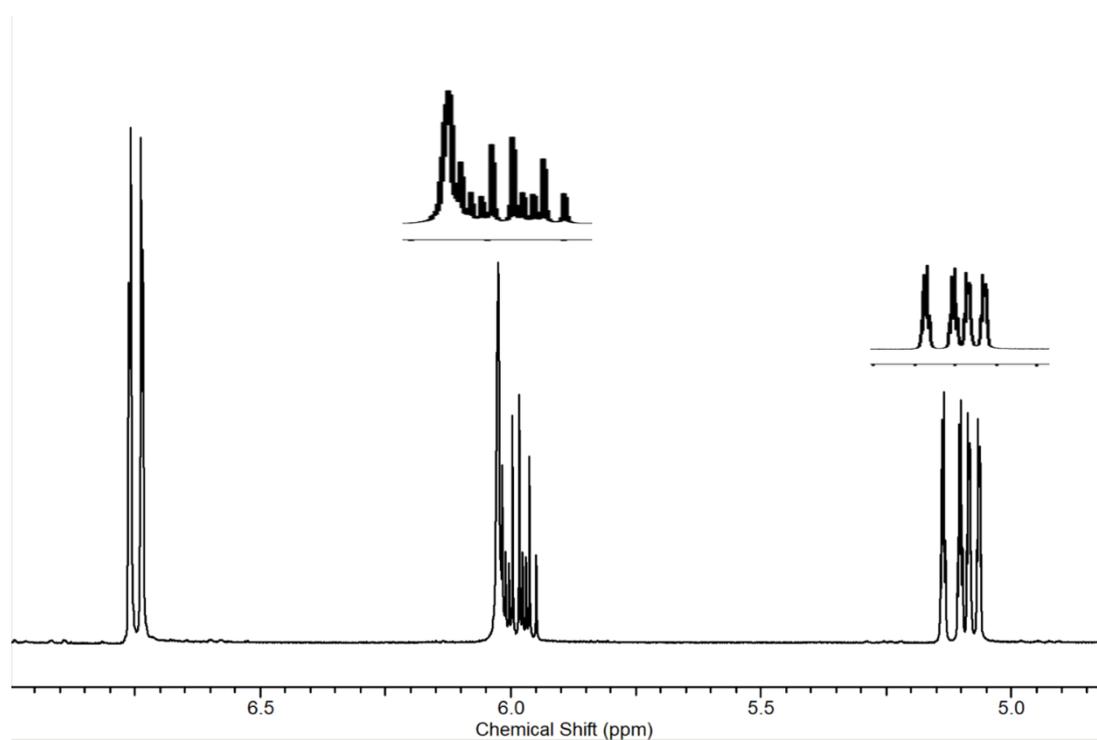


Figure S6. Expansion (δH 4.8-7.0 ppm) of ^1H NMR spectrum of bis-eugenol (CDCl_3 , 500 MHz)

**ARTIGO III – USO DE DERIVADOS DE EUGENOL NO CONTROLE DA
OXIDAÇÃO LIPÍDIA EM CARNE MECÂNICAMENTE SEPARADA DE AVES**

Artigo redigido conforme as normas da UFLA

“Versão Preliminar”

**USE OF EUGENOL DERIVATIVES IN THE CONTROL OF LIPID OXIDATION IN
MECHANICALLY SEPARATED POULTRY MEAT**

Vanuzia Rodrigues Fernandes Ferreira^a, Cassia Duarte Oliveira^b, Gabriela Aguiar
Campolina^b, Alex Rodrigues Silva Caetano^a, Marielle Maria de Oliveira Paula^b, Devid Lee
Nelson^c, Eduardo Mendes Ramos^b, Maria das Graças Cardoso^{a*}

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, 37200-900, MG, Brasil.

^b Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, 37200-900, MG, Brasil.

^c Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 39100-000, MG, Brasil.

***Autor Correspondente**

Contato: +55 35 3829-1202; Fax: +55 35 3829-1271; E-mail: mcardoso@.ufla.br.

Cx. Postal 3037, 37.200.000 – Lavras-MG.

Resumo

O efeito antioxidante da adição de diferentes concentrações (250 a 2000 ppm) de eugenol, acetato de eugenila e bis-eugenol na estabilidade oxidativa de carne mecanicamente separada (CMS) de frango foi avaliado durante armazenamento de oito dias a 0 °C. O tipo e a concentração de antioxidante não afetaram a oxidação lipídica (TBARS e hexanal), que apresentaram apenas um ligeiro aumento no índice de TBARS no oitavo dia, diferindo do controle, que apresentou aumento linear de TBARS e hexanal a partir dos dias 4 e 2, respectivamente. Maior oxidação proteica e maior conteúdo de compostos voláteis característicos de processos oxidativos durante o armazenamento foi observado para a CMS do controle. O tipo de antioxidantes não alterou a cor, mas a adição contribuiu para uma CMS mais clara em relação ao controle. Baixas concentrações (250 mg/Kg) de eugenol e seus derivados é suficiente para manter a estabilidade oxidativa de CMS de frango.

Palavras-chave: Acetato de eugenila. Bis-eugenol. Antioxidante Natural. Oxidação lipídica. Produtos cárneos.

1. INTRODUÇÃO

A forte demanda externa e o aumento do consumo interno de carnes de aves em decorrência do cenário econômico mundial têm impactado o mercado. Em 2022, espera-se uma produção e exportação de 14,72 e 4,17 milhões de toneladas de aves, respectivamente, no Brasil (GAINReport, 2021). Mas, a preferência dos consumidores por cortes nobres, produtos de conveniência e filés de peito de frango resulta em grande quantidade de dorsos e pescoços que são partes menos nobres do frango e de baixo valor agregado (de ALMEIDA, et al., 2015; TRINDADE et al., 2008). Uma alternativa de aproveitamento dessas partes menos nobres envolve a desossa mecânica, que é um processo de trituração das carcaças para remoção da carne dos tecidos aderentes ao osso, formando uma pasta de carne e osso denominada carne mecanicamente separada (CMS) (CEGIELKA et al., 2019; PEREIRA et al., 2011). O aproveitamento das carcaças de frango na forma de CMS produz uma fonte de proteína de qualidade e baixo custo, com excelente propriedade nutricional e funcional, adequada para formulação de muitos produtos cárneos (de ALMEIDA et al., 2015, PEREIRA et al., 2011). A CMS é amplamente usada no processamento de produtos cárneos cozidos, especialmente em produtos emulsionados como mortadela e salsichas, e que no Brasil, pode substituir até 60% da carne nesses produtos (BRASIL, 2000).

Apesar de ser uma matriz importante para a indústria de alimentos, a CMS é altamente oxidável, pois o aquecimento e a ruptura nas membranas musculares, durante sua produção, expõem as membranas lipídicas a íons metálicos (especialmente o ferro), ao oxigênio e à luz, facilitando interações de ácidos graxos insaturados e proteínas com substâncias pró-oxidantes (ANSARIAN et al, 2022). Por causa de sua composição instável, diversas estratégias tecnológicas e a adição de antioxidantes têm sido estudadas para aumentar a qualidade e favorecer a aplicação segura de CMS na produção de alimentos (ANSARIAN et al, 2022; HAĆ-SZYMAŃCZUK et al., 2019; MIELNIK; AABY; SKREDE, 2003). Além disso, muitos trabalhos têm utilizado CMS como matriz para avaliação da atividade antioxidante na pesquisa e desenvolvimento de novos antioxidantes naturais ou sintéticos, principalmente com aplicação em mortadelas, salsichas, hambúrgueres, nuggets, entre outros (MOHAMED; MANSOUR, 2012; SARICAOGLU; TURHAN, 2019; TRINDADE et al., 2008).

Antioxidantes são compostos capazes de impedir, retardar e inibir a oxidação de substratos orgânicos, mesmo quando usados em pequenas quantidades (<1%, geralmente 1–1000 mg/L) em comparação com a quantidade de material a ser protegido (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013). Os constituintes de óleos essenciais se mostram eficazes como

antioxidantes em carnes e produtos cárneos, principalmente os compostos fenólicos, como o eugenol e seus derivados de estrutura guaiacol (KARRE; LOPEZ; GETTY, 2013; NAVIKAITE-SNIPAITIENE et al., 2018; TALÓN et al., 2019). O eugenol é um dos fenilpropanoides mais abundantes e de fácil obtenção na natureza e, por estar disponível em grandes quantidades e com preços acessíveis, tem sido exaustivamente estudado como antioxidante e conservante de alimentos, mas sua aplicabilidade na indústria é limitada por suas características sensoriais (KAUFMAN, 2015; TALÓN et al., 2019). Modificações estruturais simples na molécula de eugenol, como a acetilação e dimerização, podem potencializar a atividade antioxidante e favorecer a aplicabilidade desses produtos na indústria de alimentos. O acetato de eugenila é um éster de eugenol que tem sido investigado devido às suas propriedades antioxidante e antimicrobiana (CANDIDO-JUNIOR et al., 2022; MUSTHAFA et al., 2016) e de acordo com o Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, é considerado seguro para ser usado em produtos alimentícios (JECFA, 2005). Já o bis-eugenol foi inicialmente desenvolvido para ser um antioxidante mais potente e menos tóxico que o eugenol, e tem sido estudado por suas diversas atividades biológicas, principalmente seu potencial anti-inflamatório, que está intimamente relacionado com sua capacidade eliminadora de radicais livres (BITTENCOURT-MERNAK et al., 2021; BORTOLOMEAZZI et al., 2010). Assim, no presente trabalho, objetivou-se avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de eugenol e de seus derivados sintéticos, acetato de eugenila e bis-eugenol, na estabilidade oxidativa de CMS de frango.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matérias-primas

O acetato de eugenila e o bis-eugenol foi sintetizado a partir do eugenol comercial de acordo com método descrito por Wang et al. (2012) e Guzmán et al. (2019), respectivamente.

As matérias-primas para a carne mecanicamente separada de frango (CMS) foram dorsos de frango, contendo pescoço e pele, que foram adquiridos congelados no comércio local em três períodos distintos (repetições independentes). O material congelado foi conduzido ao Laboratório de Tecnologia de Carnes Derivados (LabCarnes/ UFLA), e a CMS foi obtida utilizando um desossador mecânico do tipo rosca sem fim (PV Máquinas; Chapecó, SC, Brazil), com capacidade de 100 Kg/h e rendimento de CMS próximo a 60%.

2.2 Tratamentos

Em cada uma das três séries experimentais (bateladas), 12 porções de 500 g foram separadas imediatamente, após a obtenção da CMS e adicionados de diferentes concentrações (250, 500, 1000 e 2000 ppm) de eugenol, acetato de eugenila e bis-eugenol, seguido de homogeneização manual. CMS sem nenhum tratamento foi tomado como controle. Os tratamentos e controle foram divididos em cinco porções (100 g cada) e foram acondicionadas em embalagens plásticas, que foram armazenados em câmara climática (modelo EL202; Eletrolab, São Paulo, SP, Brazil) a 0 °C.

Após 0, 2, 4, 6 e 8 dias de armazenamento, a avaliação da estabilidade oxidativa foi conduzida por meio de ensaios de índice de peróxido, índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), oxidação proteica, identificação de compostos voláteis e quantificação de hexanal. As amostras também foram avaliadas quanto à cor instrumental e todas as análises foram conduzidas em triplicata.

2.3 Análise centesimal

Porções de 100 g de cada batelada de CMS foram separadas antes dos tratamentos para determinação da composição centesimal (umidade, proteína total, gordura e cinzas) e teor de colágeno, conduzida por espectroscopia no infravermelho próximo em aparelho FoodScan™ (Foss Analytical A/S, Hillerod, Dinamarca).

2.4 Índice de peróxido

O índice de peróxido foi avaliado pelo método PCA-FOX (perchloric acid ferric-xyleneol orange peroxide assay) proposto por Gay e Gebicki (2002), com modificações descritas por Dutra et al. (2017). Para isso, 6 g foram trituradas por 30 s com 25 mL de metanol refrigerado (-18 °C) em aparelho tipo Turrax (Turratec TE-102; Tecnal Equipamentos Científicos; Piracicaba, SP, Brazil). A mistura foi centrifugada (K14-4000; KASVI, São José do Pinhais, PR, Brazil) por 3 min a 1400×g e alíquotas (100 e 200 µL) do sobrenadante foram transferidos para tubos de ensaio contendo 200 µL de solução estoque FOX (alaranjado de xilol tetrasódico, 2,5 mM; sulfato ferroso de amônio hexahidratado, 2,5 mM) e o volume final foi ajustado para 2 mL com água destilada. As misturas foram incubadas por 60 min ao abrigo de luz, e foram realizadas leituras de absorbância a 560 nm em espectrofotômetro Genesys 10 UV (Thermo Scientific Varian, Sao Paulo, SP, Brazil) contra o branco (1800 µL de água destilada e 200 µL de solução FOX). O índice de peróxido foi determinado a partir da curva

analítica de hidroperóxido de cumeno (CHP), e os resultados foram expressos em miligramas de CHP por quilograma de produto (mg CHP/Kg).

2.5 Índice de TBARS

O índice de TBARS foi determinado pelo método de extração aquosa descrito por Pikul, Leszczynski e Kummerow (1989), com modificações. Cerca de 5 g de amostra foi adicionada de 15 mL de ácido perclórico (3,86 %) e 1 mL de solução de hidroxibutiltolueno (BHT) 0,15 % (p/v), e a mistura foi triturada em triturador mecânico do tipo Turrax por 10 s. Após filtração, uma alíquota de 2 mL foi adicionada de 2 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,02 M e agitada em vortex (Norte Científica, NA 3600). A mistura foi incubada por exatos 30 min a 90 °C. Após o resfriamento em banho de gelo por 10 min, realizaram-se leituras de absorbância a 532 nm. O índice de TBARS foi determinado a partir da curva analítica de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) e os resultados foram expressos em miligramas de malondialdeído (MDA) por quilograma de produto (mg MDA/Kg).

2.6 Oxidação proteica

A análise de oxidação proteica foi realizada pelo ensaio espectrofotométrico de determinação de compostos carbonílicos após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), seguindo metodologia descrita por Soglia, Petracci e Ertbjerg (2016), com modificações. Cerca de 1 g de amostra foi adicionada de 10 mL de solução de KCl 0,15 M (a 4 °C), e a mistura foi homogeneizada em um homogeneizador tipo Turrax por 10 s. Cinco alíquotas de 100 µL do homogenato foram misturadas com 1 mL de TCA 10 % (p/v) e centrifugadas a 3000 g por 10 min (EBA21; Hettich, Tuttingen, Germany). O sobrenadante de cada alíquota foi descartado, o *pellet* foi ressuspensão em 400 µL de dodecilsulfato de sódio (SDS) 5 % (p/v), e a mistura foi aquecida a 100 °C por 10 min, seguido de banho ultrassônico (UNIQUE UltraClear, USC-750A) a 40 °C por 30 min. Três das alíquotas foram tratadas com 0,8 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 0,3 % (p/v; em HCl 3 M) e as outras duas alíquotas com 0,8 mL de HCl 3 M (branco). Após 40 min de incubação ao abrigo de luz, 400 µL de TCA 40 % foram adicionados para precipitar as proteínas, e o sobrenadante foi separado por centrifugação a 3000 g por 10 min. O sobrenadante foi removido e o *pellet* lavado três vezes com 1 mL de solução de etanol-acetato de etila (1:1, v:v), seguido de centrifugação a 3000×g por 10 min. Após a lavagem final, os grânulos resultantes foram secos por 20 min em capela de exaustão e dissolvidos em 1,5 mL de cloridrato de guanidina 6 M em tampão fosfato de

sódio (NaH_2PO_4 20 mM; pH 6,5), agitados em vortex e incubados por 12 h a 4 °C. Após a incubação, a absorbância a 280 e 370 nm foi medida para quantificar a concentração de proteína e o teor de carbonila, respectivamente. O teor de carbonila ([Carb]), expresso em nmol/mg de proteína, foi calculado de acordo com a seguinte Equação 1:

$$[\text{Carb}] = \frac{\text{Abs}_{370} - \text{Abs}_{370}^{\text{blank}}}{22.000 \times [\text{Abs}_{280} - (\text{Abs}_{370} - \text{Abs}_{370}^{\text{blank}}) \times 0,43]} \times 10^6 \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que, Abs_{370} e Abs_{280} é a absorbância das amostras em 370 e 280 nm, respectivamente, e $\text{Abs}_{370}^{\text{blank}}$ é a absorbância do branco em 370 nm.

2.7 Análise de voláteis e quantificação de hexanal

A separação e identificação dos compostos orgânicos voláteis (VOC) foram realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (GC/MS; QP2010 Plus, Shimadzu, Japan), em coluna cromatográfica SLBTM (5 % *phenyl*- 95 % *dimethylsiloxane*; 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), segundo modificações do procedimento descrito por Kim et al. (2008).

A extração dos VOC foi realizada em *headspace* por microextração em fase sólida (SPME) em fibra DVB/CAR/PDMS (*Divinylbenzene, Carboxen, and Polydimethylsiloxane*, 1 cm, 50-30 µm de espessura de filme; marca Supelco), previamente limpa a 250 °C por 5 min. Na extração, 2,5 g de amostras foram pesadas em *vial* de 22 mL, seladas com um septo de silicone/PTFE e aquecidas por 10 min a 60 °C em bloco de aquecimento. A fibra foi exposta ao *headspace* por 45 min, para a extração dos compostos voláteis e foi injetada em injetor automático para líquidos e gases (AOC-5000; Shimadzu, Japan) operando em modo *splitless*, em temperatura de 250 °C, com exposição programada de 5 minutos para completa dessorção. Hélio (He) foi utilizado como gás de arraste em fluxo de 1,00 mL/min. O forno foi programado com uma rampa de temperatura iniciando em 35 °C por 2 min, com um aumento de 2 °C/min até 80 °C e de 4 °C/min até 150 °C e de 150 °C a 230 °C, a uma taxa de 8 °C/min.

A detecção dos VOC foi realizada por espectrometria de massas por impacto de elétrons (70 eV) no modo *scan* (45 a 350 Da), com um corte de solvente em 0,55 min. A temperatura da interface do detector e da fonte de íons permaneceu em 250 °C e 200 °C, respectivamente. Os VOC foram identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com espectros de massas fornecidos pelo banco de dados do *software* (Wiley 139 e FFNSC 13) com até 95 % de similaridade e confirmados pelos índices de retenção, calculados

pela equação de Van Den Dool e Kratz (1963) em relação à série homóloga de alcanos (nC_8 - nC_{18}), com extrapolação para C_{19} e C_{20} . Os índices de retenção calculados foram comparados com os índices de retenção da literatura, segundo Adams (2017).

Uma curva analítica de hexanal foi preparada (0,004 a 0,1630 $\mu\text{g/mL}$) e analisada nas mesmas condições de identificação dos VOC para quantificação de hexanal (em $\mu\text{g/g}$) nos tratamentos.

2.8 Cor instrumental

Os índices de cor foram avaliados no sistema CIELCh usando um colorímetro-espectrofotômetro CM-700 (Konica Minolta Sensing Inc, Osaka, Japão) com uma porta de abertura de 8 mm, iluminante D65, ângulo de observação de 10° e o modo de componente especular excluído (SCE). As coordenadas de luminosidade (L^*), saturação (C^*) e ângulo de tonalidade (h , graus) foram registradas após leitura em cinco pontos distintos da superfície de CMS, acomodadas em placas de Petri (80 x 15 mm) preenchidas com CMS (tratamentos e controle) e seladas com plástico filme transparente, nos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 de armazenamento a 0°C .

2.9 Análise estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema de parcelas subdivididas, com o fator 3 (antioxidantes) \times 5 (concentração) na parcela, e os tempos de armazenamento, na subparcela. Os efeitos principais e de interação foram avaliados por ANOVA usando o software Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA), e considerando o nível de significância de 5%. As médias foram separadas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

As relações entre os VOC dentro dos tratamentos, incluindo o tempo de armazenamento, foram explorados por análise de componentes principais (PCA) usando o software SensoMaker, v1.91 (UFLA, Brasil). As áreas obtidas nos cromatogramas foram normalizadas (transformadas em \log_{10}) antes do PCA, favorecendo a verificação de qualquer separação entre os grupos dentro dos efeitos estudados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

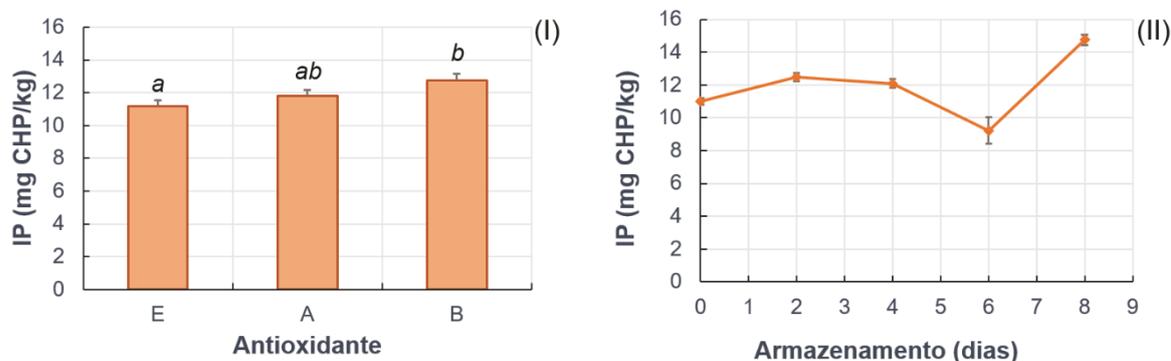
3.1 Composição centesimal

A composição centesimal média da CMS obtida foi de $66,65 \pm 0,79$ % de umidade, $13,65 \pm 0,47$ % de proteína, $16,60 \pm 0,50$ % de gordura e $3,16 \pm 0,36$ % de cinzas. O teor de colágeno foi de $0,43 \pm 0,12$ %. A composição química da CMS depende da matéria-prima utilizada e do processo de desossa mecânica (HAC-SZYMAŃCZUK et al., 2019). Os resultados obtidos estão de acordo com os exigidos pela Legislação brasileira, que estabelece mínimo de 12 % de proteína, máximo de 30 % e 1,5 % de gordura e teor de cálcio, respectivamente (BRASIL, 2000).

3.2 Oxidação Lipídica

A rancidez oxidativa é a principal causa da deteriorização de carnes e de produtos cárneos e envolve principalmente a oxidação de ácidos graxos insaturados, em diferentes estágios durante o armazenamento. No estágio inicial, verifica-se o desenvolvimento de peróxidos e hidroperóxidos, que são produtos primários da oxidação. O processo oxidativo prossegue com a formação de produtos secundários, como aldeídos (malondialdeído), álcoois e outros compostos voláteis, entre eles o hexanal, que tem sido utilizado como marcador da oxidação lipídica (AMARAL; SILVA; LANNES, 2018). Assim, o grau de oxidação lipídica foi avaliado pela quantificação de hidroperóxidos (índice de peróxido), aldeídos (índice de TBARS) e hexanal formados. Em relação ao índice de peróxido, não houve interação ($P < 0.05$) entre os fatores, mas foi verificado efeito significativo isolado dos antioxidantes e dos tempos de armazenamento. Maior índice de peróxido foi observado na CMS contendo o antioxidante B do que nas amostras contendo o antioxidante E, e o tratamento A apresentou efeito intermediário na formação de hidroperóxidos, independentemente da concentração utilizada (FIGURA II). Durante o armazenamento, foi verificada uma oscilação nos valores de índice de peróxido, independentemente do tratamento e da concentração utilizada, com um aumento nos primeiros dias, redução no 6º dia e novo aumento no 8º dia (FIGURA III).

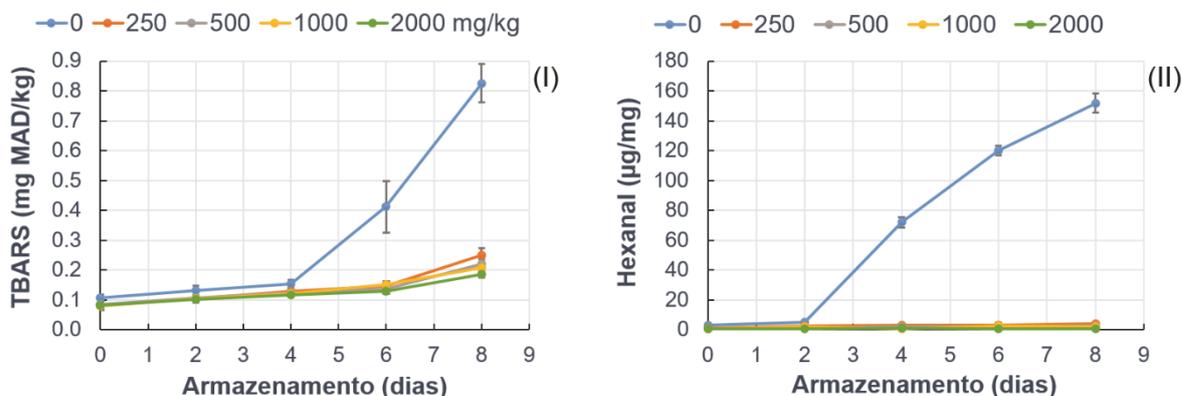
Figura 1 - Média dos efeitos da adição de eugenol (E), acetato de eugenila (A) e bis-eugenol (B): (I) - Índice de peróxidos (IP) de carne mecanicamente separada (CMS) de frango, armazenadas a 0 °C, média das diferentes concentrações (250 a 2000 mg/Kg) de antioxidante e do tempo de armazenamento. (II) - Variação do índice de peróxidos (IP) de carne mecanicamente separada (CMS) de frango, média do controle e tratamentos, durante o período de armazenamento. CHP = hidroperóxido de cumeno.



Barras representam o erro-padrão da média. Fonte: Do autor (2022).

Para o índice de TBARS e conteúdo de hexanal nas amostras, foi verificada uma interação significativa entre a concentração de antioxidante utilizada e o tempo de armazenamento. Em ambas as análises, não foi verificado efeito do antioxidante, ou de sua interação nos tratamentos, ou seja, o tipo do antioxidante utilizado não afetou a oxidação lipídica. Da mesma forma, a concentração de antioxidante adicionado não afetou a oxidação lipídica, uma vez que as diferenças observadas foram em relação ao controle (0 de adição). Para as amostras adicionadas de antioxidantes, foi observado um ligeiro aumento do índice de TBARS com o tempo de armazenamento nos primeiros 6 dias, com um índice de TBARS médio de $0,22 \pm 0,05$ mg MDA/Kg no 8º dia (FIGURA 2I). Já os valores de hexanal não se alteraram ($P > 0,05$) nas amostras tratadas com antioxidantes durante todo o armazenamento (FIGURA 2II). De forma contrária, nas amostras não adicionadas de antioxidantes (controle), foi verificado um aumento nos índices de TBARS a partir do 4º dia de armazenamento e, na formação de hexanal a partir do 2º dia, atingindo valores médios finais de $0,83 \pm 0,19$ mg MDA/Kg e $0,15 \pm 0,02$ mg/mg, respectivamente, no 8º dia.

Figura 2 - Média dos efeitos da adição de diferentes concentrações (250 a 2000 mg/Kg) de antioxidantes (eugenol, acetato de eugenila e bis-eugenol) e controle: (I) - índice de TBARS e (II) conteúdo de hexanal em carne mecanicamente separada (CMS) de frango armazenada a 0 °C. MAD = malondialdeído.



Barras representam o erro padrão da média. Linhas representam a média dos tratamentos e controle.
Fonte: Do autor (2022).

Todos os antioxidantes utilizados (eugenol, acetato de eugenila e bis-eugenol) foram capazes de prevenir a oxidação lipídica que leva à formação de aldeídos, como o malondialdeído e hexanal, em uma matriz que é altamente oxidável e em condições drásticas de armazenamento. Por ser altamente instável e susceptível à oxidação, a Legislação Brasileira estabelece que a CMS pode ser armazenada a 0 °C por no máximo 3 dias após sua obtenção, com preservação de suas características (BRASIL, 2000). No entanto, o que se observou é que, mesmo em pequenas concentrações (250 ppm), o eugenol, acetato de eugenila e bis-eugenol adicionados à CMS foram capazes de manter a estabilidade oxidativa dessa matriz por até 8 dias de estocagem a 0 °C. Estes resultados corroboram a capacidade de compostos fenólicos presentes em extratos de plantas e óleos essenciais na manutenção da estabilidade oxidativa em CMS. De acordo com Hać-Szymańczuk et al. (2019), o óleo essencial de orégano foi eficaz em retardar a oxidação lipídica em CMS armazenada a - 18 °C por nove meses. Da mesma forma, Cegiełka et al. (2019) relataram que extratos de *Salvia officinalis* L. aumentaram a estabilidade de armazenamento de CMS de frango a - 18 °C por nove meses. Mielnik, Aaby e Skrede (2003) adicionaram antioxidantes comerciais em carne de peru desossada mecanicamente e observaram que os antioxidantes contribuíram para o controle da oxidação lipídica durante sete meses de armazenamento congelado a -25 °C. Os autores ressaltaram a importância do tipo e concentração do antioxidante no processo de preservação da qualidade oxidativa de matrizes cárneas.

Os derivados sintéticos apresentaram o mesmo potencial antioxidante que o eugenol, prevenindo a oxidação de substratos altamente oxidáveis, como a CMS de frango. Esperava-se que os tratamentos contendo acetato de eugenila apresentassem potencial antioxidante menor do que os demais, uma vez que a modificação estrutural elimina a hidroxila fenólica nesse composto, tornando menos ativo na eliminação de radicais livres (FERREIRA et al., 2019, NISAR et al., 2021). Entretanto, o que se percebe é que existe uma interação química entre o acetato de eugenila e a matriz cárnea, que contribui para que ele exerça uma atividade semelhante ao eugenol. O bis-eugenol também apresentou potencial antioxidante igual ao eugenol, mesmo possuindo o dobro de sítios de doação de hidrogênios que seu monômero e sendo citado pela literatura como um antioxidante mais potente que o eugenol (OGATA et al., 2000).

3.3 Oxidação Proteica

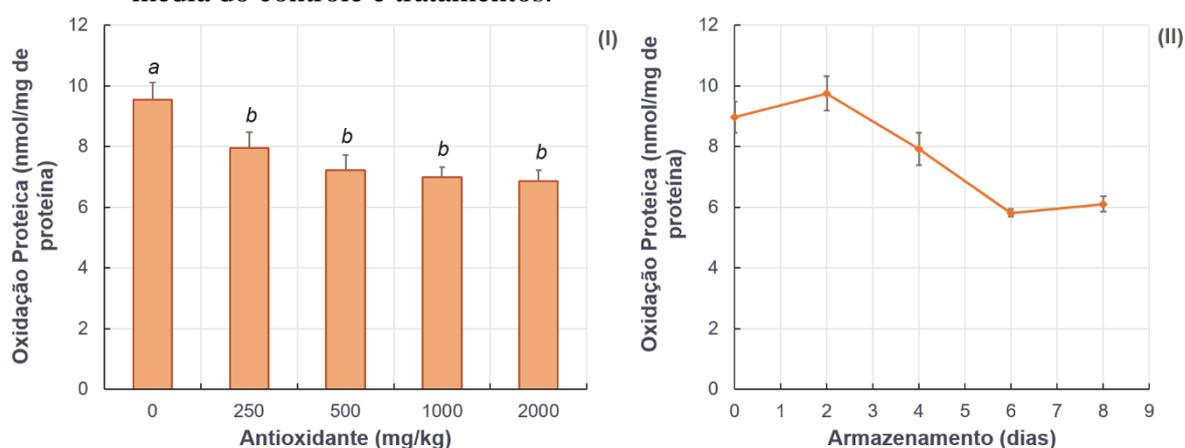
Diferenças no teor de carbonila total da CMS durante o armazenamento foram significativas apenas para a concentração de antioxidante e tempo de armazenamento de forma isolada. Amostras contendo eugenol, acetato de eugenila e bis-eugenol apresentaram oxidação proteica menor do que a amostra controle (0 de adição), independentemente da concentração utilizada (FIGURA 3I). Ao longo do tempo de armazenamento, foi observada uma redução nos teores médios de carbonilas totais para todos os tratamentos (FIGURA 3II).

O mecanismo de oxidação de proteínas é complexo e ainda não foi compreendido em sua totalidade. Sabe-se que a oxidação de cadeias laterais de aminoácidos é iniciada por espécies reativas de oxigênio (radicais OH^{\bullet}) ou por produtos secundários da oxidação lipídica (glioxal, malondialdeído, 4-hidroxinonenal) dando origem a diferentes intermediários (AUGUSTYNIAK et al., 2015). Antioxidantes, sintéticos e naturais provavelmente atuam na etapa de inicialização, estabilizando radicais e impedindo as reações de carbonilação. Esse mecanismo explicaria os menores níveis de carbonilas de proteínas encontrados ao longo do período de armazenamento em amostras tratadas com antioxidantes naturais relatados na literatura (de CARVALHO et al., 2020; PATEIRO et al., 2018), e o efeito que foi verificado no presente trabalho.

As carbonilas de proteínas são bons indicadores para avaliar a progressão da oxidação proteica, e espera-se um aumento no teor de radicais carbonila ao longo do tempo de armazenamento (JOKANOVIĆ et al., 2020; WANG et al., 2020). Entretanto, um efeito contrário foi observado no presente trabalho, no qual se verifica uma diminuição no conteúdo

de carbonilas com o tempo. A contagem de carbonilas pelo ensaio de DNPH apresenta inúmeras vulnerabilidades e pode ser subestimada pela formação de bases de Schiff entre os resíduos de aminoácidos e as carbonilas reativas que são formadas no início da oxidação proteica ou pela formação de intermediários não reativos a DNPH (AUGUSTYNIAK et al., 2015; GEORGIU et al., 2018). Além disso, Augustyniak et al. (2015) verificaram que em caso de oxidação severa de proteínas, o conteúdo de carbonilas totais pode cair devido a reações em cadeia que ocorrem nos diferentes resíduos de aminoácidos, dificultando o monitoramento da oxidação por ensaios espectrofotométricos. Isso, no entanto, provavelmente não justifica a queda observada no presente trabalho, uma vez que os resultados dos ensaios de TBARS e hexanal sugerem um controle nos níveis de oxidação lipídica ao longo do tempo de estocagem nos tratamentos com os antioxidantes. Ao mesmo tempo, espera-se uma oxidação proteica drástica em CMS, assim como ocorre com a lipídica, devido ao processo de remoção da carne dos ossos que compreende de uma etapa extrema de moagem e aquecimento localizado durante a desossa mecânica, com quebra da estrutura miofibrilar, desnaturação de proteínas e aumento de lipídios e grupos heme livres oriundos da medula óssea (PEREIRA et al., 2011).

Figura 3 - (I) - Média do efeito da adição de diferentes concentrações de antioxidantes (eugenol, acetato de eugenila e bis-eugenol) nas concentrações de 250 a 2000 mg/Kg e controle (0 mg/Kg) sobre a oxidação proteica em CMS de frango durante todo o armazenamento a 0 °C. (II) - Variação da oxidação proteica durante o período de armazenamento em carne mecanicamente separada (CMS) de frango, média do controle e tratamentos.



Barras representam o erro-padrão da média. Linhas representam a média dos tratamentos e controle.
Fonte: Do autor (2022).

de Carvalho et al. (2020) também observaram diminuição nos níveis de carbonila em linguças de cordeiro com extrato de *Curcuma longa* L. durante os primeiros seis dias de

armazenamento. Pateiro et al. (2018), avaliando o extrato de semente de guaraná como antioxidante natural em hambúrgueres suínos, verificaram uma redução no teor de carbonilas durante os primeiros sete dias, seguida de aumento progressivo até o final do período de armazenamento. Dessa forma, ensaios com maior período de armazenamento são necessários para descrever com confiança a ação antioxidante do eugenol e seus derivados sintéticos sobre a oxidação de proteínas em matrizes cárneas.

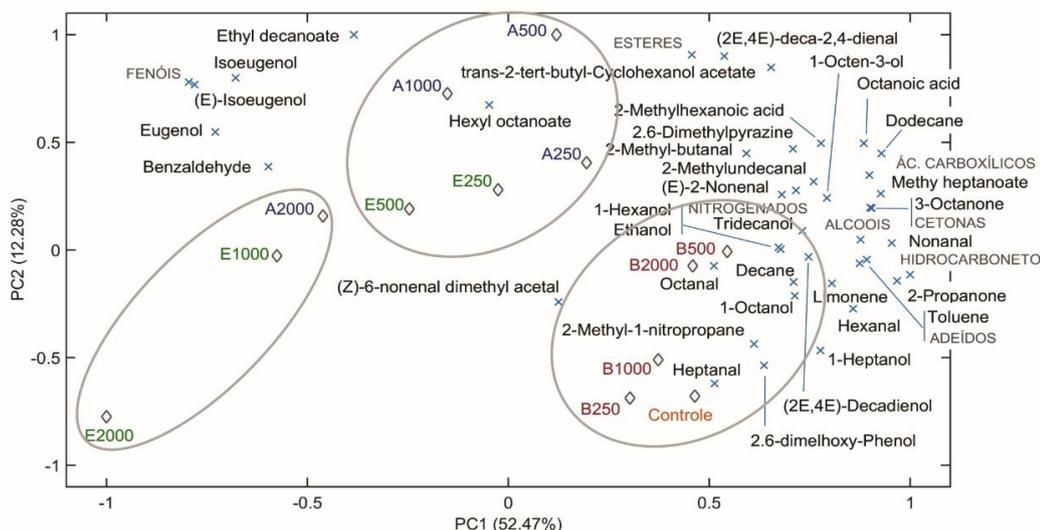
3.4 Perfil de compostos voláteis

Um total de 34 VOC foram identificados no controle e tratamentos ao longo do período de armazenamento. Entre as classes de compostos, observou-se a ocorrência de nove aldeídos, oito álcoois, seis compostos aromáticos, três hidrocarbonetos, três ésteres, dois cetonas, dois ácidos carboxílicos e dois compostos nitrogenados.

Para verificar as diferenças entre os tratamentos, os VOC identificados foram agrupados por meio da análise de componente principal (PCA; FIGURA 4), descrevendo 64,75% da variação total. Observa-se uma diferença distinta entre os tratamentos e suas concentrações na formação de compostos voláteis, separando-os em três grupos: um grupo contendo eugenol e acetato de eugenila em altas concentrações (E1000, E2000 e A2000) e que possui alta prevalência de compostos fenólicos; um grupo contendo todos os tratamentos de bis-eugenol (B) e a amostra controle, no qual há uma alta ocorrência de álcoois, aldeídos, ácidos carboxílicos, cetonas e hidrocarbonetos e baixa prevalência de compostos fenólicos; e um grupo intermediário contendo os demais tratamentos de eugenol (E) e acetato de eugenila (A).

É importante ressaltar que o composto acetato de eugenila não foi identificado nos tratamentos em que foi adicionado (A). Isso provavelmente se deve a uma interação desse composto com os constituintes presentes na matriz da CMS, que podem ter contribuído para a desacetilação do acetato de eugenila a eugenol. Compostos fenólicos como eugenol e isoeugenol não foram identificados nos tratamentos contendo bis-eugenol, o que indica que, diferentemente do acetato de eugenila, o bis-eugenol não se quebra para a formação de eugenol na matriz cárnea.

Figura 4 - Análise de componentes principais (PCA) bi-plot de compostos orgânicos voláteis (VOC) formados em carne mecanicamente separada (CMS) de frango armazenada a 0 °C por oito dias. Tratamentos: sem adição de antioxidantes (Controle); e com adição de eugenol (E), acetato de eugenila (A) e bis-eugenol (B) em diferentes concentrações (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg).



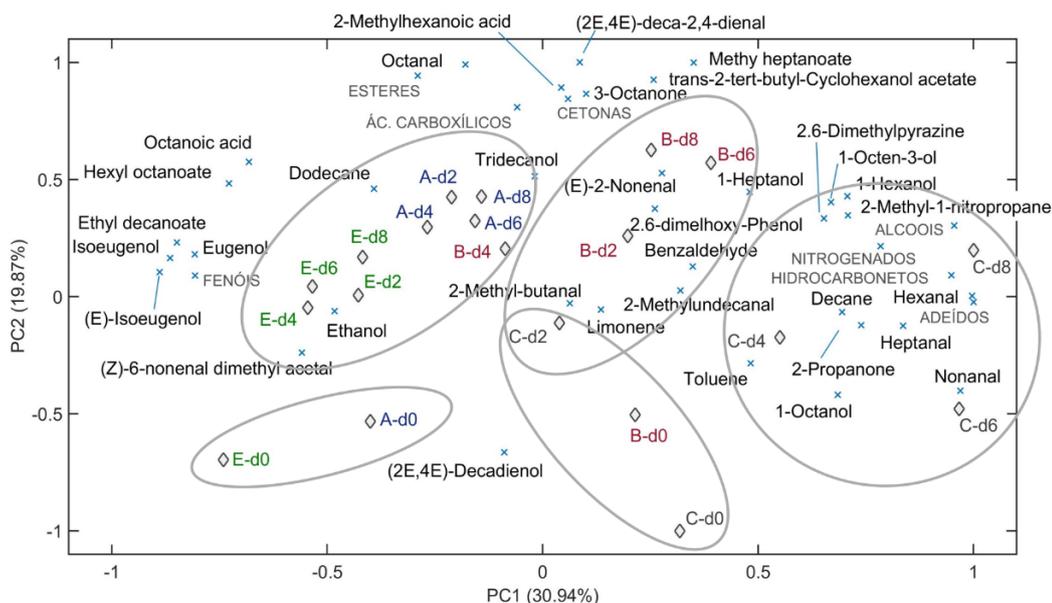
Fonte: Do autor (2022).

A PCA também foi realizada para verificar a influência dos tratamentos com antioxidantes (independentemente da concentração) e o tempo de armazenamento sobre a formação de VOC na CMS (PCA; FIGURA 5), descrevendo 50,81% da variação total com formação de cinco grupos. O grupo contendo as amostras-controle nos dias 4, 6 e 8 (C-d4, C-d6 e C-d8) possui alta correlação com compostos dos grupos de aldeídos (entre eles o hexanal), álcoois, hidrocarbonetos e compostos nitrogenados característicos de processos oxidativos. O comportamento descrito na análise de PCA é coerente com os resultados observados nos ensaios de índice de TBARS e oxidação proteica, em que os tratamentos, independentemente da concentração, foram eficazes em controlar a oxidação durante o armazenamento.

Entre os compostos voláteis encontrados nos tratamentos, destacam-se o (2E,4E)-decadienal, que é caracterizado com aldeído volátil isolado da gordura de frango, o limoneno, que contribui com notas adocicadas em carne de frango (SHAHIDI et al., 1986), e os compostos 2-methyl-butanal, heptenal, octanal, limoneno, 2,6-dimethylpyrazine e 2,6-dimelhoxy-phenol, que estão relacionados ao sabor e aroma grelhado/amanteigado, gorduroso, frutado/azedo, assado/noz e defumado/doce, respectivamente (HADDAD et al.,

2022; KOSOWSKA; MAJCHER; FORTUNA, 2017; RAMALINGAM; SONG; HWANG, 2019).

Figura 5 - Análise de componentes principais (PCA) bi-plot de compostos orgânicos voláteis (VOC) formados em carne mecanicamente separada (CMS) de frango não-tratadas (C, controle) e tratadas com antioxidantes (E, eugenol; A acetato de eugenila; e B, bis-eugenol) em diferentes tempos de armazenamento (d, dias: 0, 2, 4, 6 e 8) a 0°C.



Fonte: Do autor (2022).

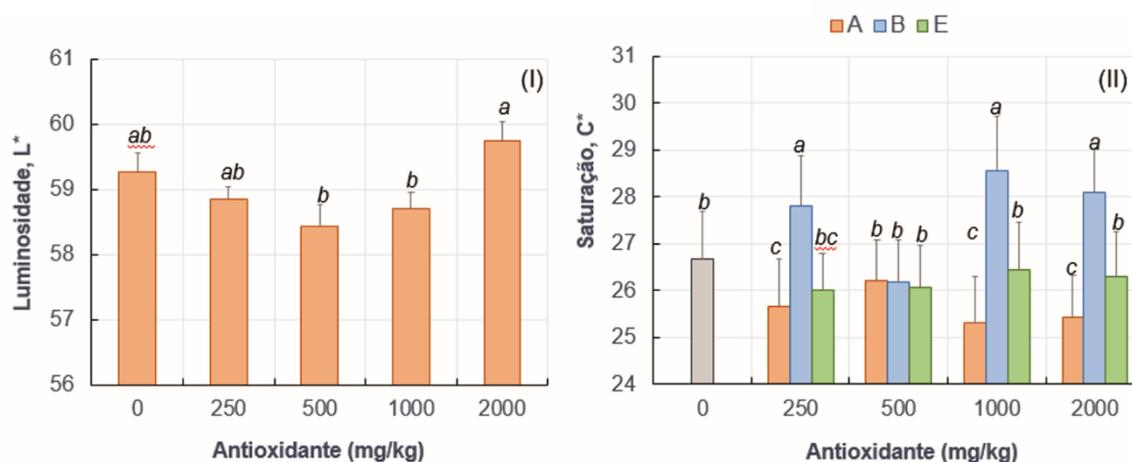
Ao longo do tempo de armazenamento, verificou-se aumento na formação de compostos, que são característicos da oxidação lipídica, como hexanal, heptanal, nonanal, 1-octanol, octen-3-ol, hexanol e decano (KOSOWSKA; MAJCHER; FORTUNA, 2017; SHAHIDI et al., 1986; WATANABE et al., 2015), e da oxidação proteica, como a formação de 2-metil-pirazine, tolueno e benzaldeído (WATANABE et al., 2015). Esses compostos foram correlacionados no PCA com o grupamento contendo as amostras-controle nos dias 6 e 8, sendo responsáveis pelo desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis de ranço em matrizes cárneas (RAMALINGAM; SONG; HWANG, 2019; SETYABRATA et al., 2021). Além dos produtos de oxidação lipídica e proteica, a presença de 2-metil-1-nitropropano e 2-propanona no grupo controle, com o tempo de armazenamento, é indicativa de contaminação e fermentação bacteriana (CITRON; RABE; DICKSCHAT, 2012; SETYABRATA et al., 2021).

3.5 Cor instrumental

A cor é um atributo tridimensional, sendo descrita pela luminosidade (L^*), que indica a claridade da amostra, a saturação (C^*), que representa a intensidade da cor, e o ângulo de tonalidade (h), que descreve a matiz, ou cor propriamente dita (RAMOS; GOMIDE, 2017). Os índices de cor (L^* , C^* e h) das CMS foram afetados de forma distinta pela adição de antioxidantes e pela concentração, mas todos foram afetados pelo tempo de armazenamento.

O antioxidante utilizado afetou o valor de L^* , reduzindo a luminosidade nas concentrações de 500 e 1000 mg/Kg (FIGURA 6I), independentemente do tipo de antioxidante utilizado. Além disso, enquanto os valores de C^* das amostras adicionadas de eugenol (E) não diferiram das amostras-controle (sem adição de antioxidante), a cor das amostras adicionadas de bis-eugenol (B) foram mais intensas e as de acetato de eugenila (A) menos intensas nas concentrações de 250, 1000 e 2000 mg/kg do que as demais amostras (FIGURA 6II). Já a tonalidade da cor da CMS não foi alterada por nenhum dos tratamentos.

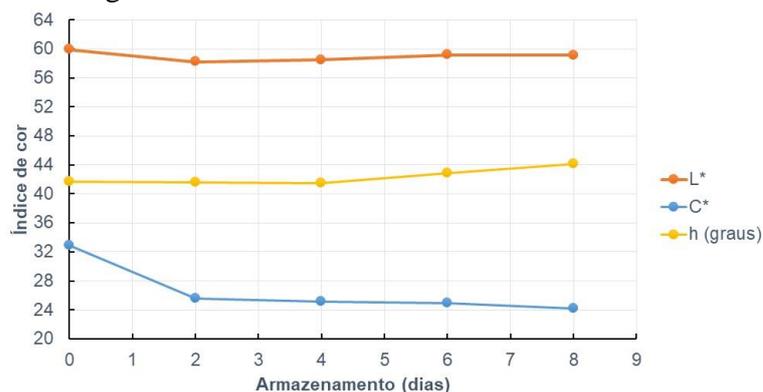
Figura 6 - Média dos efeitos da concentração de antioxidantes (E, eugenol; A, acetato de eugenila; e B, bis-eugenol) e controle (0 mg/Kg) sobre os índices de cor: (I) luminosidade (L^*) e (II) saturação (C^*) de carne mecanicamente separada (CMS) armazenada por oito dias a 0 °C.



Barras representam o erro padrão da média. Fonte: Do autor (2022).

Em carnes *in natura*, a oxidação da mioglobina a metamioglobina, pigmento de cor marrom, induz a uma redução nos valores de C^* e aumento nos valores de L^* e h (AROEIRA et al., 2017). Exceto pelos valores de C^* nas amostras adicionadas de acetato de eugenila (A), essas alterações não foram observadas nas amostras com os tratamentos. No entanto, esses índices foram afetados pelo tempo de armazenamento (FIGURA 7), e cujo comportamento é indicativo de processos oxidativos nas amostras de CMS.

Figura 7 - Média do efeito de armazenamento (a 0 °C) sobre os índices de cor luminosidade (L*), saturação (C*) e ângulo de tonalidade (h) da carne mecanicamente separada (CMS) de frango tratamentos e controle.



Fonte: Do autor (2022).

CONCLUSÃO

A modificação estrutural do eugenol não afetou a atividade antioxidante dos derivados, acetato de eugenila e bis-eugenol, avaliados em CMS de frango. Todos os antioxidantes foram eficazes em retardar a oxidação lipídica e proteica de CMS de frango durante o armazenamento a 0 °C, na menor concentração avaliada (250 ppm), quando comparado ao controle sem antioxidante. Os antioxidantes, não alteraram a coloração da CMS após o tratamento, apenas deixaram a matriz cárnea mais clara que o controle. Ensaio com avaliação dessas CMS tratadas com os antioxidantes, na menor concentração, em produtos cárneos, são necessários para determinação do efeito antioxidante e da influência sensorial do eugenol e seus derivados em produtos cárneos contendo CMS.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”. Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG); o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). Os autores agradecem à Central de Análise e Prospecção Química da Universidade Federal de Lavras.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram não haver interesse financeiro concorrente.

REFERENCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. 4th ed. Carol Stream: Allured, 2017:469p.

AMARAL, A. B.; SILVA, M. V.; LANNES, S. C. S. Lipid oxidation in meat: mechanisms and protective factors—a review. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 1-15, 2018. <https://doi.org/10.1590/fst.32518>.

AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10835-10847, 2013. DOI: 10.1021/jf403496k.

ANSARIAN, E. et al. Nanoemulsion-based basil seed gum edible film containing resveratrol and clove essential oil: In vitro antioxidant properties and its effect on oxidative stability and sensory characteristic of camel meat during refrigeration storage. **Meat science**, v. 185, p. 108716, 2022.

AROEIRA, C. N. et al. Effect of freezing prior to aging on myoglobin redox forms and CIE color of beef from Nellore and Aberdeen Angus cattle. **Meat Science**, v. 125, p. 16-21, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.11.010>.

AUGUSTYNIAK, E. et al. Validation of protein carbonyl measurement: a multi-centre study. **Redox biology**, v. 4, p. 149-157, 2015. DOI:10.1016/j.redox.2014.12.014.

BITTENCOURT-MERNAK, M. I. et al. Effects of Eugenol and Dehydrodieugenol B from *Nectandra leucantha* against Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Experimental Acute Lung Inflammation. *Journal of Natural Products*, v. 84, n. 8, p. 2282-2294, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00386>

BORTOLOMEAZZI, R.; VERARDO, G.; LIESSI, A.; CALLEA, A. Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 256-265, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.115>.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. Publicado no Diário Oficial da União de 05/04/2000, seção 1, p. 6, 2000. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-sda-4-de-31-03-2000,662.html>>.

CANDIDO JÚNIOR, J. R. et al. Antioxidant activity of eugenol and its acetyl and nitroderivatives: the role of quinone intermediates—a DFT approach of DPPH test. *Journal*

of Molecular Modeling, v. 28, n. 5, p. 1-15, 2022. <https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00894-022-05120-z>.

CEGIELKA, A. et al. The use of bioactive properties of sage preparations to improve the storage stability of low-pressure mechanically separated meat from chickens. **Poultry Science**, v. 98, n. 10, p. 5045-5053, 2019. DOI: 10.3382/ps/pez242.

CITRON, C. A.; RABE, P.; DICKSCHAT, J. S. The scent of bacteria: headspace analysis for the discovery of natural products. **Journal of natural products**, v. 75, n. 10, p. 1765-1776, 2012. <https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1021/np300468h>.

de ALMEIDA, M. A. et al. Quality attributes and consumer acceptance of new ready-to-eat frozen restructured chicken. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 2869-2877, 2015. DOI: 10.1007/s13197-014-1351-5.

de CARVALHO, F. A. L. et al. Turmeric (*Curcuma longa* L.) extract on oxidative stability, physicochemical and sensory properties of fresh lamb sausage with fat replacement by tiger nut (*Cyperus esculentus* L.) oil. **Food Research International**, v. 136, p. 109487, 2020. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109487.

DUTRA, M. P. et al. Combined effects of gamma radiation doses and sodium nitrite content on the lipid oxidation and color of mortadella. **Food chemistry**, v. 237, p. 232-239, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.05.108.

FERREIRA, V.R.F. et al. Colorimetric, electroanalytical and theoretical evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium aromaticum* L., *Origanum vulgare* L., *Mentha spicata* L. and *Eremanthus erythropappus* M. essential oils, and their major constituents. **New J. Chem.**, v. 43, n. 20, p. 7653-7662, 2019. DOI: 10.1039/C8NJ05893H.

GAIN Report - Global Agricultural Information Network. Poultry and Products Annual. <https://usdabrazil.org.br/wp-content/uploads/2021/09/Poultry-and-Products-Annual_Brasilia_Brazil_09-01-2021-1.pdf>. Acesso em 03 de Junho de 2022.

GAY, C. A.; GEBICKI, J. M. Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylene orange peroxide assay. **Analytical biochemistry**, v. 304, n. 1, p. 42-46, 2002. DOI: 10.1006/abio.2001.5566.

GEORGIU, C. D. et al. Protein and cell wall polysaccharide carbonyl determination by a neutral pH 2, 4-dinitrophenylhydrazine-based photometric assay. **Redox biology**, v. 17, p. 128-142, 2018. DOI: 10.1016/j.redox.2018.04.010.

GUZMÁN, D. et al. Fully renewable thermosets based on bis-eugenol prepared by thiol-click chemistry. **Reactive and Functional Polymers**, v. 136, p. 153-166, Mar, 2019. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2018.12.024.

HĄC-SZYMAŃCZUK, E. et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) preparations during storage of low-pressure mechanically separated meat (BAADER meat) from chickens. **Food science and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 449-457, 2019. DOI: 10.1007/s10068-018-0491-1.

HADDAD, G. D. B. S. et al. Accelerating the dry aging of bone-in beef from Nellore cattle by the freeze/thaw process. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 7, p. e16573, 2022. DOI: 10.1111/jfpp.16573.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) WHO Technical Report Series, 934 (2005), pp. 7-16. In:
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43408/WHO_TRS_934_eng.pdf;jsessionid=0ED37AC453691B1BFB12EF0418A5933E?sequence=1. (Accessed Mar, 29, 2022).

JOKANOVIĆ, M. et al. Essential oil and supercritical extracts of winter savory (*Satureja montana* L.) as antioxidants in precooked pork chops during chilled storage. **LWT**, v. 134, p. 110260, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110260.

KARRE, L.; LOPEZ, K.; GETTY, K. J. K. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Science**, v. 94, p. 220-227, 2013. DOI:10.1016/j.meatsci.2013.01.007.

KAUFMAN, T. S. The multiple faces of Eugenol. A versatile starting material and building block for organic and bio-organic synthesis and a convenient precursor toward bio-based fine chemicals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 6, p. 1055-1085, Jun, 2015. DOI:10.5935/0103-5053.20150086

KIM, J. H. et al. Reduction of volatile compounds and off-odor in irradiated ground pork using a charcoal packaging. **Journal of muscle foods**, v. 19, n. 2, p. 194-208. 2008. DOI: 10.1111/j.1745-4573.2008.00112.x.

KOSOWSKA, M.; A MAJCHER, M.; FORTUNA, T. Volatile compounds in meat and meat products. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 1-7, 2017. DOI: 10.1590/1678-457X.08416.

MIELNIK, M. B.; AABY, K.; SKREDE, G. Commercial antioxidants control lipid oxidation in mechanically deboned turkey meat. **Meat science**, v. 65, n. 3, p. 1147-1155, 2003. DOI: 10.1016/S0309-1740(02)00345-5.

MOHAMED, H. M.; MANSOUR, H. A. Incorporating essential oils of marjoram and rosemary in the formulation of beef patties manufactured with mechanically deboned poultry meat to improve the lipid stability and sensory attributes. **LWT-Food Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 79-87, Jan, 2012. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.07.031.

MUSTHAFI, K. S. et al. Antifungal potential of eugenyl acetate against clinical isolates of *Candida* species. *Microbial pathogenesis*. v. 99, p. 19-29, Oct, 2016. DOI:10.1016/j.micpath.2016.07.012.

NAVIKAITE-SNIPAITIENE, V. et al. Development of antioxidant food packaging materials containing eugenol for extending display life of fresh beef. **Meat science**, v. 145, p. 9-15, 2018. DOI:10.1016/j.meatsci.2018.05.015

NISAR, M. F. et al. Pharmacological properties and health benefits of eugenol: a comprehensive review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021. DOI:10.1155/2021/2497354.

OGATA, M. et al. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, n. 10, p. 1467-1469, Oct, 2000. DOI: 10.1248/cpb.48.1467.

PATEIRO, M. et al. Guarana seed extracts as a useful strategy to extend the shelf life of pork patties: UHPLC-ESI/QTOF phenolic profile and impact on microbial inactivation, lipid and protein oxidation and antioxidant capacity. **Food Research International**, v. 114, p. 55-63, 2018. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.07.047.

PEREIRA, A. G. T. et al. Effects of the addition of mechanically deboned poultry meat and collagen fibers on quality characteristics of frankfurter-type sausages. *Meat science*, v. 89, n. 4, p. 519-525, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.05.022>.

PIKUL, J.; LESZCZYNSKI, D. E.; KUMMEROW, F. A. Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 1309-1313, 1989. DOI: 10.1021/jf00089a022.

RAMALINGAM, V.; SONG, Z.; HWANG, I. The potential role of secondary metabolites in modulating the flavor and taste of the meat. **Food research international**, v. 122, p. 174-182, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.007>.

Ramos, E. M., & Gomide, L. A. M. (2017). *Meat quality assessment: fundamentals and methodologies*. Viçosa, MG, Brazil: Editora UFV.

SARICA OGLU, F. T.; TURHAN, S. Performance of mechanically deboned chicken meat protein coatings containing thyme or clove essential oil for storage quality improvement of beef sucuks. *Meat science*, v. 1, n. 158, p. 107912, Dec, 2019. DOI: 10.1016/j.meatsci.2019.107912.

SETYABRATA, D. et al. Elucidating mechanisms involved in flavor generation of dry-aged beef loins using metabolomics approach. **Food Research International**, v. 139, p. 109969, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109969>.

SHAHIDI, F. et al. Meat flavor volatiles: A review of the composition, techniques of analysis, and sensory evaluation. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 141-243, 1986. <https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1080/10408398609527435>.

SOGLIA, F.; PETRACCI, M.; ERTBJERG, P. Novel DNPH-based method for determination of protein carbonylation in muscle and meat. **Food chemistry**, v. 197, p. 670-675, 2016. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.11.038.

TALÓN, E. et al. Antioxidant starch-based films with encapsulated eugenol. Application to sunflower oil preservation. *LWT*, v. 113, p. 108290, 2019 b. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108290.

TALÓN, E. et al. Encapsulation of eugenol by spray-drying using whey protein isolate or lecithin: Release kinetics, antioxidant and antimicrobial properties. **Food chemistry**, v. 295, p.588-598, Oct, 2019 a. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.05.115.

TRINDADE, M. A. et al. Estabilidade oxidativa e microbiológica em carne de galinha mecanicamente separada e adicionada de antioxidantes durante período de armazenamento a -18° C. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 160-168, 2008. DOI: 10.1590/S0101-20612008000100023.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

WANG, X. et al. Design and synthesis of novel pyrethroids containing eugenol moiety. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 10, p. 2827-2830, 2012. DOI: 10.1007/s00044-011-9809-8.

WANG, Z. et al. Using oxidation kinetic models to predict the quality indices of rabbit meat under different storage temperatures. **Meat science**, v. 162, p. 108042, 2020. DOI: 10.1016/j.meatsci.2019.108042.

WATANABE, A. et al. Effect of aging on volatile compounds in cooked beef. **Meat science**, v. 107, p. 12-19, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.04.004>.

ARTIGO IV- UTILIZAÇÃO DE CARNE MECÂNICAMENTE SEPARADA DE AVES PRÉ-MISTURADA COM DERIVADOS DE EUGENOL NA ELABORAÇÃO DE MORTADELA CURADA E NÃO CURADA

Artigo redigido conforme as normas da UFLA

“Versão Preliminar”

USE OF MECHANICALLY SEPARATED POULTRY MEAT PRE-BLENDED WITH EUGENOL DERIVATIVES IN THE ELABORATION OF CURED AND UNCURED MORTADELLA

Vanuzia Rodrigues Fernandes Ferreira^a, Angélica Souza Guimarães^b, Pamela Aparecida dos Santos^a, Alcinéia de Lemos Souza Ramos^b, Marcelo Estefanini Tanaka^b, Devid Lee Nelson^c, Eduardo Mendes Ramos^b, Maria das Graças Cardoso^{a*}

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, 37200-900, MG, Brasil.

^b Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, 37200-900, MG, Brasil.

^c Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 39100-000, MG, Brasil.

***Autor correspondente**

Contato: +55 35 3829-1202; Fax: +55 35 3829-1271; E-mail: mcardoso@.ufla.br.

Cx. Postal 3037, 37.200.000 – Lavras-MG.

RESUMO

Objetivou-se no presente trabalho avaliar o uso de CMS adicionadas de antioxidantes derivados de eugenol na qualidade tecnológica e sensorial de mortadelas elaboradas com e sem adição de nitrito e avaliar a estabilidade oxidativa delas durante o armazenamento fatiado por 60 dias. Os tratamentos não alteraram as características tecnológicas dos produtos, melhoraram as características sensoriais e não interferiram na formação de cor dos produtos curados e não curados. Nas mortadelas curadas, os tratamentos contendo acetato de eugenila e bis-eugenol apresentaram menor oxidação lipídica (MDA) do que o controle e os tratamentos com eugenol. Em mortadelas-não curadas, o eugenol e seus derivados apresentaram o mesmo efeito, controlando a formação de MDA ($0,73 \pm 0,20 \text{ mg MDA Kg}^{-1}$), quando comparados ao controle ($1,24 \pm 0,42 \text{ mg MDA Kg}^{-1}$). Maior aceitação sensorial foi observada nos tratamentos curados. Eugenol e seus derivados melhoraram os atributos sensoriais dos produtos e os tratamentos contendo bis-eugenol não apresentaram sabor de cravo-da-índia. Durante o período de armazenamento fatiado, o eugenol e seus derivados auxiliaram igualmente na redução das reações oxidativas nas mortadelas não curadas e nenhum efeito oxidativo foi observado durante o armazenamento no grupo de mortadelas curadas. Os tratamentos não afetaram a estabilidade da cor curada nas mortadelas e não influenciaram na pigmentação e estabilidade da cor obtida pelo uso de corante carmim de cochonilha. O eugenol e seus derivados têm potencial antioxidante em produtos não curados, e os compostos acetato de eugenila e bis-eugenol podem ser utilizados em associação com nitrito de sódio em produtos curados.

PALAVRAS-CHAVE: Antioxidantes, Produtos emulsionados. Oxidação lipídica. Análise sensorial.

1. INTRODUÇÃO

Carne mecanicamente separada (CMS) é um subproduto da indústria alimentícia utilizada como ingrediente em produtos cárneos, especialmente em emulsionados, como salsichas e mortadelas (MILLER et al., 2021). No Brasil, a substituição da carne *in natura* por CMS na formulação desses produtos é prevista por lei, podendo chegar até a 60%. (BRASIL, 2000). Apesar de essa substituição fornecer acesso barato à proteína animal, torna o produto cárneo mais susceptível à degradação oxidativa, necessitando de aditivos como antioxidantes e sais de cura para um maior controle de qualidade (MONSALVE-ATENCIO et al., 2021). A utilização do aditivo nitrito de sódio é importante em produtos cárneos, principalmente os contendo CMS, pois além do processo de cura, esses sais atuam no controle microbiológico e oxidativo, auxiliando na manutenção da qualidade desses produtos (DUTRA et al., 2017). O nitrito age como antioxidante, prevenindo a oxidação lipídica induzida e catalisada por íons ferro livres, uma vez que atua como quelante de ferro livre e diminui a liberação desses íons pela estabilização dos pigmentos heme (RIVERA; MARISA; MARTIN, 2019). Entretanto, uma alternativa a esses sais de cura tem sido cada vez mais desejada, uma vez que estudos indicam a formação de nitrosaminas cancerígenas a partir de nitrito e aminas secundárias em produtos cárneos curados (DUTRA et al., 2017). Esse risco à saúde do consumidor tem levado a uma demanda de mercado crescente por produtos cárneos sem adição de nitrito, que ressalta a importância de se propor novas formas para a conservação da qualidade oxidativa desses produtos (BALDIN et al. 2018; GUIMARÃES et al., 2021; JÚNIOR et al., 2019).

A contribuição essencial do nitrito na qualidade de produtos cárneos curados torna difícil a tarefa de reduzi-lo ou substituí-lo completamente (DUTRA et al., 2017). Antioxidantes naturais têm demonstrado eficácia no controle da oxidação lipídica de produtos cárneos, sendo a presença de compostos fenólicos nos extratos, chás, farinhas e óleos essenciais extraídos de plantas essencial para esse controle (BAK; RICHARDS, 2021). A combinação de antioxidantes naturais com sais de cura pode ser uma alternativa para redução e posterior substituição de nitritos em produtos cárneos. Uma vez que antioxidantes podem atuar sinergicamente com sais de cura na preservação da estabilidade oxidativa, sensorial e na formação da cor vermelha de produtos, como mortadelas (TRINDADE et al., 2008).

Óleos essenciais são uma fonte de constituintes que podem ser explorados como antioxidantes naturais para manutenção da qualidade oxidativa de alimentos em associação ou substituição aos antioxidantes convencionais (JÚNIOR et al., 2019; PINELLI et al. 2021). Entre esses constituintes, destaca-se o eugenol, que apresenta potencial antioxidante igual ou superior aos antioxidantes usuais (FERREIRA et al., 2019; TALÓN et al., 2019 a). Porém, a

aplicação do eugenol é limitada devido às suas características sensoriais que alteram o sabor e aroma dos produtos e causam rejeição por parte dos consumidores (RESENDE et al., 2017; TALÓN et al., 2019 b). As características sensoriais da molécula de eugenol são inerentes à sua estrutura básica e posição de seus substituintes (SCHRANZ et al., 2017). Entretanto, seus derivados acetato de eugenila e bis-eugenol, por apresentarem substituintes distintos aos do eugenol, podem exercer maior ou igual atividade antioxidante, sem alterar drasticamente as características sensoriais do produto em que são adicionados (BITTENCOURT-MERNAK et al., 2021). Esses derivados naturais de eugenol possuem baixa ocorrência natural, mas podem ser sintetizados com alta pureza e bons rendimentos a partir do eugenol comercial (FERREIRA et al., 2022-ARTIGO II, submetido à publicação). O acetato de eugenila possui classificação GRAS e pode ser incorporado a alimentos, sem risco à saúde do consumidor, e o bis-eugenol foi sintetizado inicialmente para ser um antioxidante mais potente e menos tóxico do que o eugenol (MACHADO et al., 2017). Esses compostos apresentam diferentes potenciais biológicos e, além de poderem atuar como antioxidantes, na preservação da qualidade oxidativa, podem ser considerados bioativos quando adicionados a alimentos, atraindo ainda mais a atenção dos consumidores (da SILVA et al., 2018). Objetivou-se no presente trabalho avaliar o uso de CMS adicionadas de antioxidantes derivados de eugenol na qualidade tecnológica e sensorial de mortadelas elaboradas com e sem adição de nitrito e avaliar a estabilidade oxidativa delas durante o armazenamento fatiado por 60 dias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matérias-primas

Os derivados acetato de eugenila e bis-eugenol foram sintetizados e caracterizados por ^1H RMN e FTIR anteriormente, conforme Ferreira et al. (2022-ARTIGO II e submetido à publicação).

Dorsos de frango, contendo pescoço e pele congelados, foram adquiridos no comércio local em três períodos distintos (repetições independentes) e conduzidos ao Laboratório de Tecnologia de Carnes Derivados (LabCarnes/ UFLA) para a obtenção da carne mecanicamente separada de frango (CMS) utilizando um desossador mecânico do tipo rosca sem fim (PV Máquinas; Chapecó, SC, Brazil), com capacidade de 100 Kg/h e rendimento de CMS de 52 ± 11 %. A composição centesimal média da CMS obtida foi $65,68 \pm 1,70$ % de umidade, $15,45 \pm 0,12$ % de proteínas, $15,61 \pm 1,88$ % de gorduras e $3,26 \pm 0,08$ % de cinza.

2.2 Tratamento das CMS

Em cada uma das três bateladas (repetições independentes), a CMS de frango, após obtida, foi imediatamente separada em embalagens plásticas contendo 600 g/cada para realização dos tratamentos com 250 ppm de eugenol acetato de eugenila e bis-eugenol, respectivamente. A concentração de antioxidante utilizada nos tratamentos foi definida em estudos anteriores (FERREIRA et al., ARTIGO III, em fase de elaboração), nos quais avaliaram diferentes concentrações desses compostos na manutenção da qualidade oxidativa de CMS armazenada por 8 dias a 0 °C.

Cada tratamento foi realizado em duas porções para formulação das mortadelas curadas e não curadas. Ao todo, oito embalagens de 600 g de CMS tratadas e controles foram devidamente fechadas e congeladas por 7 dias, antes da formulação dos produtos.

2.3 Formulação e processamento das mortadelas

Dois experimentos foram conduzidos, um com formulações de mortadelas contendo nitrito (curadas) e outro sem a adição de nitrito (não curadas). Em cada uma das três bateladas (repetições independentes), as formulações de ambos os experimentos foram elaboradas no mesmo dia, em períodos distintos, utilizando as mesmas CMS tratadas.

As mortadelas foram elaboradas segundo formulação básica contendo 60 % de CMS de frango e os demais ingredientes: toucinho (11 %); gelo (20 %); cloreto de sódio (1,1 %); isolado proteico de soja (4 %), fécula de mandioca (3 %) e Global Mortadela NEW MIX (1 %, mistura contendo polifosfatos, eritorbato de sódio, glutamato monossódico e especiarias; New Max Industrial, Americana, São Paulo, Brasil). A quantidade de CMS utilizada é a máxima permitida pela Legislação brasileira (BRASIL, 2000) e foi escolhida para obtenção de um produto altamente perecível, a fim de verificar o efeito antioxidante dos tratamentos realizados. Nas mortadelas curadas, foram adicionados 0,3 % de sal de cura contendo 7 % de nitrito de sódio e, nas mortadelas não curadas, foram adicionados 0,08 % de corante carmim de cochonilha.

Quatro formulações de mortadelas curadas (designadas “M”; contendo 200 mg/kg de nitrito de sódio) e quatro de não curadas (designadas “UM”) foram elaboradas, diferenciando quanto ao tratamento da CMS: controle (M-C e UM-C), CMS sem adição de antioxidantes; e CMC com adição de 250 mg/kg de eugenol (M-E e UM-E), acetato de eugenila (M-A e UM-A) e bis-eugenol (M-B e UM-B).

Para a elaboração das mortadelas, pedaços das CMS parcialmente descongeladas (temperatura até ~0 °C) foram adicionadas ao *cutter* (SIRE cutter; Filizola S.A., Campo

Grande, MS, Brazil), juntamente com metade do gelo, sal e todos os outros ingredientes secos, e cominuídos por cerca de 15-30 s. A seguir, o toucinho e a outra metade do gelo foram adicionados, e procedeu-se à homogeneização até obtenção de uma emulsão homogênea. A massa emulsionada foi retirada do *cutter*, embutida (EP-5 filler; Industria Metalúrgica Picelli, Rio Claro, SP, Brazil) em tripa artificial de poliamida de 67 mm de diâmetro (SCHUR Equipamentos e Embalagens. Barueri, SP, Brasil), formando porções de aproximadamente 500 g, e seladas com grampeador (MLE-300; MGE Comercial Ltda, São Paulo, SP, Brazil). As mortadelas foram codificadas e cozidas em banho-maria, de acordo com a seguinte programação: 55 °C/30 min; 65 °C/30 min; 75 °C/30 min; e 85 °C até atingir 75 °C no centro geométrico (acompanhados com um termopar). Imediatamente após o cozimento, as mortadelas foram imersas em banho de água e gelo por 10 min, e armazenadas a 4 °C por 12 h para condução das análises.

Uma vez abertas as mortadelas para condução das análises tecnológicas, fatias de aproximadamente 0,5 cm de espessura de cada tratamento foram obtidas, embaladas a vácuo e armazenadas sob refrigeração (4 °C) por 0, 30 e 60 dias, para avaliação da estabilidade oxidativa e da cor.

2.4 Caracterização tecnológica das mortadelas

2.4.1 Estabilidade de emulsão

A estabilidade de emulsão foi determinada no dia da fabricação seguindo o método de Hughes, Cofrades e Troy (1997). Aproximadamente 25 g da massa crua, recém-elaborada, foram centrifugados (Centrífuga Mettich, Zentrifuger EBA21) a 3000 g por 1 min, aquecidos em banho-maria (a 70 °C) por 30 min e resfriados em água corrente. Após resfriamento, os tubos foram novamente centrifugados a 3000 g 3 min e vertidos em cadinhos de porcelana, previamente pesados, por 5 min para recolher todo o exsudado. Os cadinhos com exsudado foram pesados, deixados secar em estufa (a 105 °C) por 12 h (*overnight*) e, então, resfriados em dessecador e novamente pesados. A estabilidade da emulsão foi expressa pelo total de fluido exsudado (TEF) e pelo percentual de gordura e sólidos solúveis no exsudado (GE_{TEF}), conforme as seguintes equações:

$$TEF (\%) = 100 \times \frac{PC_{exc} - PC_i}{Pa} \quad \text{Equação 1}$$

$$GE_{TEF} (\%) = 100 \times \frac{PC_f - PC_i}{PC_{exc} - PC_i} \quad \text{Equação 2}$$

Em que *Pa* corresponde à massa crua da emulsão recém-elaborada, *PCi* massa dos cadinhos de porcelana previamente pesados, *PCexc* massa dos cadinhos contendo o exsudado recém-recolhido e *PCf* massa dos cadinhos contendo exsudado após secagem em estufa.

2.4.2 Composição centesimal e valor de pH

A composição centesimal das mortadelas foi determinada medindo-se os teores de umidade, gordura, proteína e cinzas, seguindo os protocolos da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2012). O pH das mortadelas foi determinado utilizando um pHmetro digital portátil (testo 206-pH2; Texto do Brasil, Campinas, SP, Brasil) pela inserção direta em três regiões centrais dos produtos.

2.4.3 Nitrito residual

A determinação de nitrito residual (NO_2R) foi realizada segundo procedimentos descritos por Guimarães et al. (2021). Cerca de 5 g de amostra triturada foi homogeneizada (Turratec TE-102; Tecnal Equipamentos Científicos; Piracicaba, SP, Brazil) em 40 mL de água destilada (a 80 °C), incubada em banho-maria (a 80 °C) por 2 h, e a mistura foi filtrada. O filtrado foi diluído para 250 mL com água destilada e uma alíquota de 2 mL transferida para um tubo de ensaio contendo 1 mL de água destilada e 200 μL de sulfanilamida 1% (em HCL 0,5 M). Após agitação (NA 3600; Norte Científica, Araraquara, SP, Brasil), o tubo foi mantido em repouso e ao abrigo de luz por 5 min, quando foram adicionados 6,6 mL de água destilada e 200 μL de solução N-(1-naftil) etilenodiamine hidrocloreto 0,1% (NED). A mistura foi agitada e novamente mantida em repouso ao abrigo de luz por 15 min, seguido da leitura de absorbância em espectrofotômetro (Genesys 10 UV; Thermo Scientific Varian, São Paulo, Brasil) a 540 nm. A concentração de nitrito foi quantificada utilizando-se curva analítica de nitrito de sódio, sendo os resultados expressos como miligramas de nitrito por quilograma de amostra ($\text{mg NO}_2/\text{Kg}$).

2.4.4 Índice de TBARS

O índice de TBARS foi determinado pelo método de extração aquosa descrito por Pikul, Leszczynski e Kummerow (1989), com modificações. Cerca de 5 g de amostra foram adicionados de 15 mL de ácido perclórico (3,86 %) e 1 mL de solução de hidroxibutiltolueno (BHT) 0,15 % (p/v), e a mistura foi triturada em triturador mecânico do tipo Turrax por 10 s. Após a filtração, uma alíquota de 2 mL foi adicionada de 2 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,02 M e agitada em vortex (NorteCientífica, NA 3600). A mistura foi

incubada por exatos 30 min a 90 °C. Após o resfriamento em banho de gelo por 10 min, realizaram-se leituras de absorvância a 532 nm. O índice de TBARS foi determinado a partir da curva analítica de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), e os resultados foram expressos em miligramas de malondialdeído (MDA) por quilograma de produto (mg MDA/Kg).

2.4.5 Cor instrumental

Os índices de cor no sistema CIELCh foram obtidas em colorímetro espectrofotômetro portátil CM-700 (Konica Minolta Sensing Inc, Osaka, Japão), com abertura de porta de 8 mm, ângulo de observação de 10°, iluminante D65 e luz especular excluída (SCE), conforme sugerido por Ramos e Gomide (2017). Os índices luminosidade (L^*), croma (C^*) e ângulo de tonalidade (h , graus) foram obtidos a partir de cinco leituras realizadas em diferentes pontos da superfície das fatias de mortadelas. Nas mortadelas adicionadas de nitrito, a cor curada foi determinada pela razão das refletâncias nos comprimentos de onda 650/570 nm, conforme descrito pela AMSA (2012).

2.5 Estabilidade das amostras fatiadas

Os testes de estabilidade foram realizados nas amostras fatiadas após 0, 30 e 60 dias de armazenamento (4°C). Em cada tempo, as embalagens foram abertas e a cor instrumental imediatamente analisada na superfície das amostras, conforme previamente descrito (item 2.4.5). A seguir, as amostras foram trituradas, e a estabilidade oxidativa foi mensurada pelo teste de TBARS (item 2.4.4).

2.6 Análise sensorial

A avaliação sensorial das amostras foi conduzida por um grupo de foco, conforme descrito por Pinelli et al. (2021). A sessão do teste sensorial foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Carnes e Derivados (LabCarnes) do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A aprovação das questões éticas foi obtida pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFLA (CAAE: 52333321.0.0000.5148) e os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram recrutados, aleatoriamente, 12 painelistas (não treinados), consumidores de mortadela, composto por estudantes de pós-graduação da UFLA, sendo 75% do sexo feminino e 25% do sexo masculino e com idade entre 18 a 50 anos. Os painelistas avaliaram as oito amostras (curadas e não curadas) codificadas, em ordem balanceada e monádica. As mortadelas foram fatiadas em espessuras de 0,5 cm, embaladas a vácuo, identificadas e mantidas sob refrigeração a 4° C, uma hora antes da avaliação. No momento da análise

sensorial, as embalagens foram abertas e as amostras servidas, sendo uma discussão estimulada por um moderador para o levantamento das características mais relevantes das amostras em relação aos atributos de aparência, aroma, sabor e textura identificados pelos consumidores. Os avaliadores foram instruídos a beber água para a limpeza das papilas gustativas entre as amostras.

Além disso, foi feito um levantamento sobre a frequência de consumo de mortadelas e se os avaliadores estariam dispostos a pagar mais caro por um produto contendo antioxidante derivado de compostos naturais. Também foram questionados quanto à sua percepção de diferenças de sabor entre os produtos e se conseguiram ou não perceber sabor e aroma de cravo-da-índia (cujo eugenol é o principal constituinte). Foi feita uma pesquisa do quanto gostaram ou não das amostras quanto aos atributos de aparência, aroma, sabor, textura e impressão global, por meio de uma escala hedônica estruturada de 9 pontos (1 = desgostei extremamente à 9 = gostei extremamente) (MINIM, 2013).

2.7 Análises estatísticas

Todo o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições independentes. Os dados da caracterização tecnológica das mortadelas foram dispostos em um esquema fatorial 2 (produtos; M e UM) \times 4 (tratamentos da CMS; C, E, A e B) e os efeitos principais e de interação foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), considerando o nível de significância de 5%. Os testes de estabilidade das mortadelas fatiadas foram analisados, separados para mortadelas curadas (M) e não curadas (UM), sendo os dados dispostos em um esquema fatorial 4 (tratamentos da CMS; C, E, A e B) \times 3 (tempos de armazenamento) e submetidos à ANOVA ($P < 0.05$). Quando necessário, as médias dos tratamentos foram separadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05\%$). As análises foram conduzidas utilizando o software Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA).

Para a análise sensorial, todos os dados obtidos por meio dos questionários, gravações e anotações foram lidos e estudados considerando as palavras dos avaliadores, o contexto da discussão e a especificidade das respostas. Os dados foram organizados em uma matriz com a frequência com que as características para cada atributo foram citadas e realizada uma análise de correspondência por meio do software SensoMaker v.15 (Lavras, MG, Brasil) para os principais atributos levantados durante a discussão do grupo de foco.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Caracterização tecnológica

Na Tabela 1 são apresentadas a composição centesimal e as características tecnológicas das mortadelas elaboradas. Não houve diferença ($P > 0,05$) quanto à composição centesimal das mortadelas. Apesar de apresentarem-se abaixo do limite para proteínas (mínimo de 12%), as mortadelas formuladas no presente trabalho encontram-se dentro dos valores previstos na Legislação brasileira (BRASIL, 2000) para o teor de gordura (máximo de 30%) e umidade (máximo de 65%).

Tabela 1. Composição centesimal e características tecnológicas (média \pm desvio-padrão) de mortadelas curadas (M) e não curadas (UM) formuladas com 60% de CMS de frango.

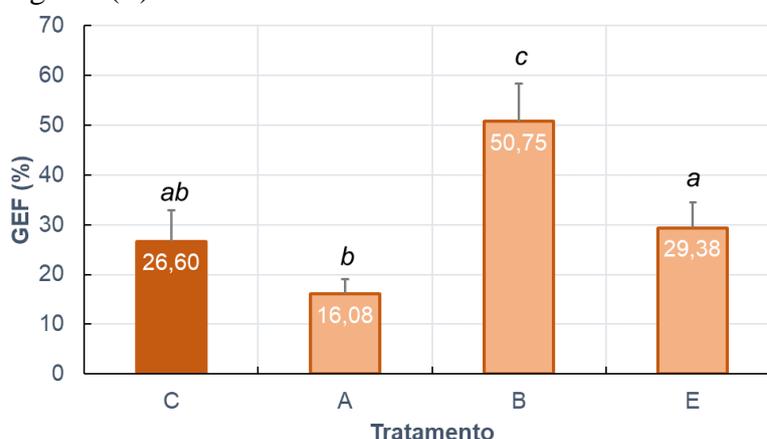
Características	M	UM	Média
Composição (%)			
Umidade	65,57 \pm 0,39	65,28 \pm 0,59	65,43 \pm 0,67
Proteínas	12,26 \pm 0,15	12,54 \pm 0,12	12,40 \pm 0,18
Gordura	16,06 \pm 2,87	16,51 \pm 3,07	16,29 \pm 2,26
Cinzas	2,61 \pm 0,08	2,45 \pm 0,08	2,53 \pm 0,12
Estabilidade da emulsão (%)			
Fluidos totais exsudados, TEF	1,47 \pm 0,93	2,07 \pm 1,06	1,77 \pm 1,02
Gordura no líquido exsudado, GEF	32,03 \pm 14,36	29,37 \pm 22,28	30,70 \pm 18,38
pH	6,40 \pm 0,04	6,38 \pm 0,04	6,39 \pm 0,04
Nitrito residual, NO ₂ R (mg/kg)	113,25 \pm 10,46	na	-
TBARS (mg MDA/Kg)	0,53 \pm 0,09 ^b	0,62 \pm 0,11 ^b	0,58 \pm 0,11
Índices de cor			
Luminosidade, L*	65,08 \pm 1,17 ^a	62,15 \pm 1,16 ^b	63,61 \pm 1,88
Saturação, C*	19,22 \pm 0,43	19,38 \pm 0,60	19,30 \pm 0,51
Tonalidade, h (graus)	53,23 \pm 1,61 ^a	60,36 \pm 2,67 ^b	56,79 \pm 4,25
Cor curada (R650/570nm)	2,18 \pm 0,06	na	-

CMS = carne mecanicamente separada; MDA = malondialdeído; na = não avaliado. ^{a,b} Médias seguidas de letras distintas diferem ($P < 0,05$) pelo teste F. Fonte: Do autor (2022).

Não houve efeito ($P > 0,05$) dos fatores ou da interação entre eles no teor de fluido exsudado (TEF) das mortadelas, mas foi verificado efeito significativo das CMS tratadas no percentual de gordura exsudada (GEF). Apesar das TEF das massas emulsionadas não terem sido afetadas pelo uso ou não do nitrito ou pelo tipo de CMS utilizada, a adição de CMS tratadas com bis-eugenol induziu a uma maior liberação de gordura no exsudado, ao passo que o uso de CMS contendo acetato de eugenila contribuiu para menores valores de GEF (FIGURA 1). A quantidade de gordura no líquido diz respeito à capacidade das proteínas miofibrilares em encapsular gorduras durante o processo de emulsificação (PEREIRA et al., 2011). Essas alterações na liberação de gordura ocasionadas nos produtos contendo bis-

eugenol e acetato de eugenila provavelmente se devem a interações entre esses compostos e as proteínas que resultaram, no primeiro caso, em uma ligeira perda de capacidade emulsificante e, no segundo, em potencialização dessa capacidade. De maneira geral, a substituição da carne in natura por CMS leva a produtos com maiores liberações de gordura no exsudado. Isso ocorre, pois, uma boa quantidade de proteína miofibrilar no teor proteico de CMS de frango é danificada durante a desossa mecânica, perdendo sua função de emulsificação de gorduras (PEREIRA et al., 2011).

Figura 1 - Efeito dos tratamentos da carne mecanicamente separada (CMS) no teor de gordura do exsudado (GEF) da massa emulsionada de mortadelas durante o cozimento. Tratamentos: CMS controle (C); e tratada com acetato de eugenila (A), bis-eugenol (B) ou eugenol (E).



Médias seguidas de letras distintas (*a-c*) diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Barras representam o erro padrão da média. Fonte: Do autor (2022).

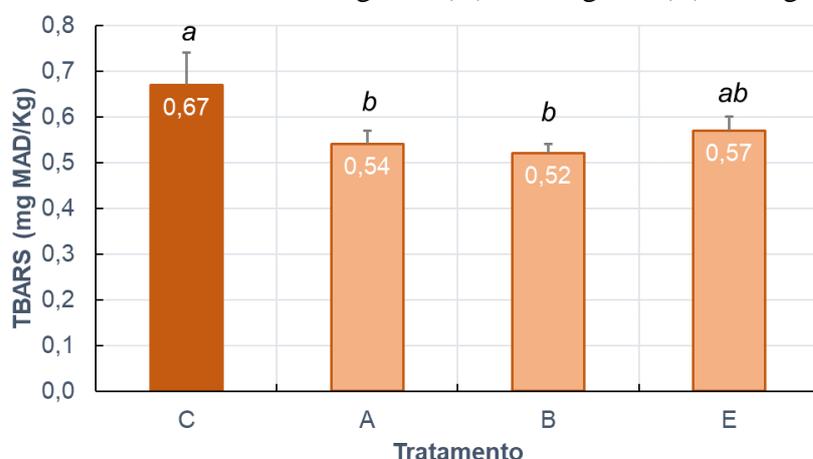
Os valores de pH não foram afetados ($P > 0,05$) por nenhum dos fatores estudados e os teores de nitrito residual (NO_2R) das mortadelas curadas também não foram afetados significativamente pelo tratamento da CMS. Os valores médios de pH das mortadelas são consistentes com os valores ($6,42 \pm 0,19$) relatados por Pinelli et al. (2021), em mortadelas formuladas com diferentes tipos de óleos essenciais. Esses autores também não encontraram efeito da adição de óleo essencial nos valores de pH das mortadelas. Quanto aos valores de NO_2R , eles se encontram abaixo do valor máximo (150 mg/kg) permitido pela Legislação brasileira (ANVISA, 2019). De acordo com Massingue et al. (2018), o nitrito adicionado é parcialmente transformado em outros compostos contendo nitrogênio, especialmente o óxido nítrico (NO), que pode se ligar a proteínas e a outros constituintes presentes na matriz cárnea. Esses autores observaram valores de NO_2R próximos de 78 mg/kg em salsichas formuladas com CMS de frango em substituição de 60% da carne ovina. Essa diferença pode estar

associada à variação na quantidade de pigmentos heme presentes nas CMS e, especialmente, na carne ovina utilizada por aqueles autores.

Quanto à oxidação lipídica, medida pelo índice de TBARS, diferenças significativas foram observadas entre as mortadelas curadas e não curadas e entre os tratamentos da CMS utilizada. O índice de TBARS nos produtos curados foi menor ($P < 0,05$) do que nos produtos não curados (TABELA 1). Isso provavelmente está relacionado ao fato de o nitrito atuar como antioxidante em sistemas curados (DUTRA et al., 2017). No entanto, em ambas as mortadelas (curadas ou não), os valores de TBARS daquelas formuladas com CMS contendo acetado de eugenila (A) e bis-eugenol (B) foram menores ($P < 0,05$) do que o controle (FIGURA 2), no qual as mortadelas contendo CMS tratada com eugenol não diferiu ($P > 0,05$) das demais. A acetilação e a dimerização do eugenol contribuíram para a formação de derivados com maior potencial antioxidante que o eugenol em produtos cárneos. O mecanismo antioxidante é complexo; além de envolver a capacidade direta do antioxidante de estabilização de radicais livres, está relacionado com interações indiretas, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes, como fazem os cofatores e alguns íons metálicos (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013). O bis-eugenol apresenta maior potencial redutor e mais sítios de doação de hidrogênios que o eugenol. Já o acetato de eugenila parece atuar em sistemas complexos como um antioxidante misto, com interações diretas e indiretas (FERREIRA et al., 2022-ARTIGO II, submetido à publicação).

Menores valores de TBARS foram relatados por Pinelli et al. (2021) para as mortadelas formuladas com óleos essenciais. Esse efeito foi atribuído pelos autores à capacidade de compostos fenólicos em prevenir a formação de radicais livres. Zhang, Wu e Guo (2016) verificaram que extratos de alecrim e cravo-da-índia são altamente eficazes no controle da oxidação e na conservação de carne de frango, apresentando potencial como antioxidante natural. De acordo com Zhang et al. (2017), a aplicação de extrato de cravo, rico em eugenol, protegeu linguiças chinesas contra oxidação e deterioração durante 21 dias de armazenamento a 4°C.

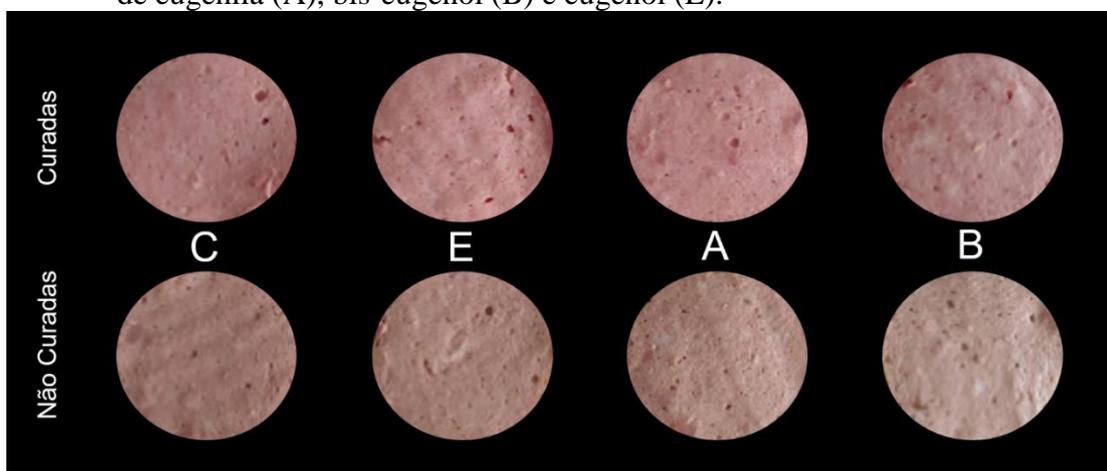
Figura 2 - Média do efeito dos tratamentos da carne mecanicamente separada (CMS) no índice de TBARS de mortadelas curadas e não curadas. Tratamentos: CMS controle (C); e tratada com acetato de eugenila (A), bis-eugenol (B) ou eugenol (E).



Médias seguidas de letras distintas (*a,b*) diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Barras representam o erro padrão da média. Fonte: Do autor (2022).

Não foi verificada interação significativa entre os fatores estudados para nenhum dos índices de cor das mortadelas, mas houve efeito ($P < 0,05$) da adição de nitrito nos valores de luminosidade (L^*) e tonalidade (h) e dos tratamentos da CMS nos valores de h . As mortadelas curadas eram mais claras (maiores valores de L^*) e possuíam um menor ângulo de tonalidade, sugerindo uma matriz mais avermelhada do que as mortadelas não curadas (FIGURA 3). A diferença na tonalidade dos produtos curados e não curados se deve a diferentes mecanismos de pigmentação. Nos produtos curados, a pigmentação das mortadelas é resultado de reações entre o nitrito de sódio e a mioglobina presente na matriz cárnea, com formação de pigmentos nitrosohemocromo, que dependem de uma série de fatores, como o teor de nitrito adicionado, a presença de espécies redutoras e o tipo de carne utilizada (DUTRA et al., 2017; GUIMARÃES et al., 2022). Já a coloração dos produtos não curados está relacionada com a quantidade de corante carmim de cochonilha adicionado, com as interações entre o ácido carmínico e os constituintes adicionados na emulsão e com a estabilidade do corante na temperatura de cozimento das mortadelas (ONGARATTO et al., 2021).

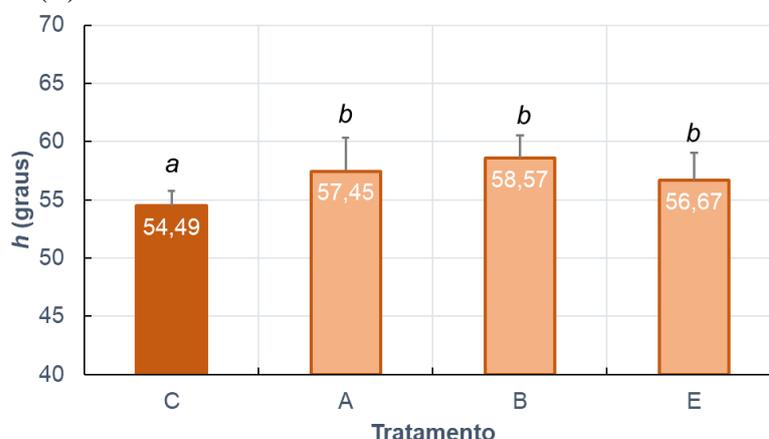
Figura 3 - Fotografia das mortadelas curadas e não curadas elaboradas com carne mecanicamente separada (CMS) não tratadas (controle; C) e tratadas com acetato de eugenila (A), bis-eugenol (B) e eugenol (E).



Fonte: Do autor (2022).

Independentemente do uso de nitrito ou não, os tratamentos da CMS com eugenol ou seus derivados induziram a um aumento ($P < 0,05$) nos valores de h em relação às amostras não tratadas (controle) (FIGURA 4). O mesmo foi relatado por de Oliveira et al. (2012), em que adições superiores a $31,25 \mu\text{l/g}$ de óleos essenciais induziram a um aumento nos valores de h em mortadelas fabricadas com e sem adição de nitrito. Segundo esses autores, esse aumento do ângulo de tonalidade sugere uma mudança da cor rosada em direção à tonalidade amarela.

Figura 4 - Média do efeito dos tratamentos da carne mecanicamente separada (CMS) no ângulo de tonalidade (h) da cor de mortadelas curadas e não curadas. Tratamentos: CMS controle (C); e tratada com acetato de eugenila (A), bis-eugenol (B) ou eugenol (E).



Médias seguidas de letras distintas (a, b) diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Barras representam o erro-padrão da média. Fonte: Do autor (2022).

Apesar das diferenças observadas nos valores de h para os tratamentos da CMS, os resultados parecem indicar que o eugenol e seus derivados adicionados à CMS não influenciaram nas reações envolvidas na formação da cor curada nas mortadelas adicionadas de nitrito. Isso é reforçado pela ausência de efeito nos valores de NO_2R e do índice de cor curada (razão $\text{R}_{650/570}$ nm) nessas mortadelas (TABELA 1). De acordo com a AMSA (2012), valores da razão $\text{R}_{650/570}$ nm entre 2,2 e 2,6 representam produtos cárneos com excelente cor curada.

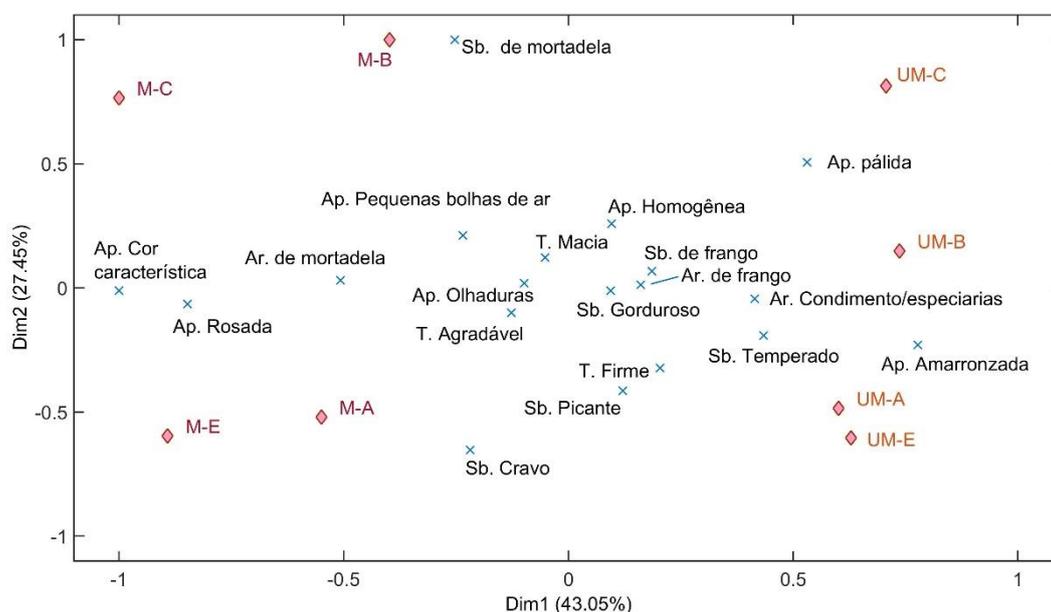
3.2 Análise sensorial

Antes da análise, os avaliadores foram questionados sobre o tipo e a frequência de produtos cárneos consumidos. Os produtos mais listados foram mortadela, seguido de empanado de frango, hambúrguer e linguiça, consumidos mensalmente por 75% dos provadores. Todos os participantes tinham conhecimento sobre a importância e o uso de antioxidantes e conservantes em alimentos e 100 % deles afirmaram estar dispostos a pagar um valor superior por produtos com aditivos naturais ou derivados de naturais, desde que apresentassem características sensoriais agradáveis.

Os atributos levantados pelos provadores foram organizados por meio de Análise de Correspondência (CA) (FIGURA 5) e as notas em gráfico de rede (FIGURA 6). De acordo com a CA, a primeira e a segunda dimensão representam 70,50% da variabilidade dos dados experimentais, com 43,05% e 27,45%, respectivamente. Observa-se que os avaliadores apontaram descritores sensoriais diferentes para as mortadelas curadas e não curadas, sendo as amostras separadas ao longo da primeira dimensão nesses dois grupos: primeiro grupo composto pelos tratamentos M-C, M-E, M-A e M-B curados e o segundo UM-C, UM-E, UM-A e UM-B não curados. Para as amostras curadas, foram mencionados principalmente os descritores de aparência rosada, cor característica de mortadela, sabor e aroma de mortadela. Já para as amostras não curadas, os descritores que caracterizam contrastes aparecem em direções opostas, tais como aparência pálida e amarronzada, sabor temperado e aroma de condimento/especiarias. Em relação aos demais descritores sensoriais, apresentaram frequência de citações semelhantes para todas as amostras.

Observando o gráfico de rede, pode-se notar que a cor teve grande influência na percepção geral dos avaliadores, que classificaram os produtos não curados como pálidos (menos rosados) com notas médias de 3 a 6 (desgostei moderadamente a gostei ligeiramente) e os produtos curados como mais rosados com média de 7 e 8 (gostei moderadamente e muito).

Figura 5 - Análise de Correspondência (CA) bi-plot descritores sensoriais apontados por avaliadores para as mortadelas elaboradas curadas (C, E, A e B) e não curadas (C*, E*, A* e B*) processadas com 60% de CMS controle (C) e CMS contendo 250 ppm de eugenol (E), acetato de eugenila (A) e bis-eugenol (B).



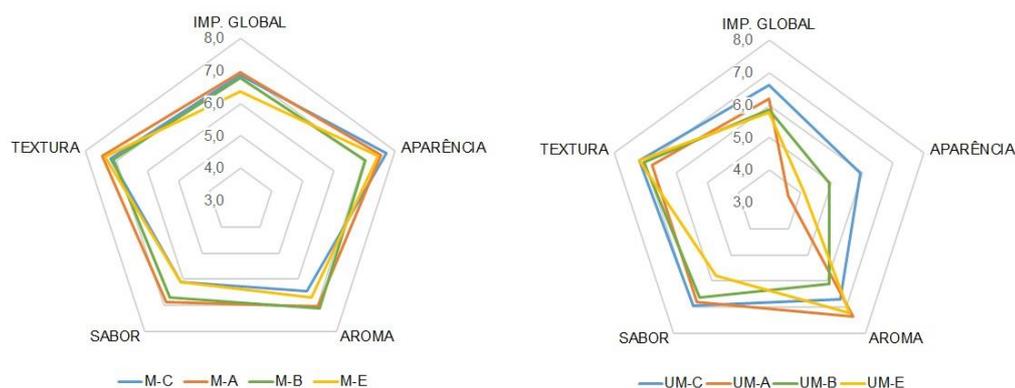
Fonte: Do autor (2022).

Os avaliadores gostaram de ligeiramente a moderadamente do aroma e do sabor dos produtos (notas 6 e 7), respectivamente, mas o aroma específico de cravo-da-índia não foi citado ou percebido por nenhum dos provadores. A concentração de 250 ppm adicionada na CMS provavelmente não é suficiente para detectar o aroma de cravo-da-índia nos tratamentos contendo eugenol e seus derivados sintéticos. De acordo com a frequência de citações, o sabor de cravo foi percebido nos tratamentos M-E, UM-E, M-A e UM-A (Figura 5), seguido de comentários sobre levemente adstringente. Pelas descrições dos provadores, a acetilação do eugenol tornou o sabor de cravo mais leve e agradável, apesar de ainda ser perceptível aos consumidores nos tratamentos M-A e UM-A. Já a dimerização do eugenol parece suprimir ou eliminar o sabor de cravo nos tratamentos com bis-eugenol (M-B e UM-B) já que os avaliadores relataram um sabor diferente, não identificado, que proporcionou um diferencial agradável ao produto.

Os tratamentos não afetaram a percepção de textura nas mortadelas; os avaliadores gostaram moderadamente (nota 7) da textura de todos os produtos (FIGURA 6). Ao final da degustação, os avaliadores organizaram as mortadelas em ordem de preferência, sendo M-A > M-B > M-E os produtos favoritos e UM-E > UM-A > UM-B os que obtiveram maior rejeição.

Como dito anteriormente, esses resultados estão principalmente relacionados à aparência, já que a adição de nitrito promove a coloração rosada. Os tratamentos foram preferidos em relação aos controles, ou seja, a adição de eugenol, acetato de eugenila e bis-eugenol melhoraram as características sensoriais de mortadelas formuladas com carne mecanicamente separada de frango.

Figura 6 - Efeito dos tratamentos da carne mecanicamente separada (CMS) nas notas atribuídas pelos provadores para mortadelas curadas e não curadas para os atributos sensoriais avaliados.



Fonte: Do autor (2022).

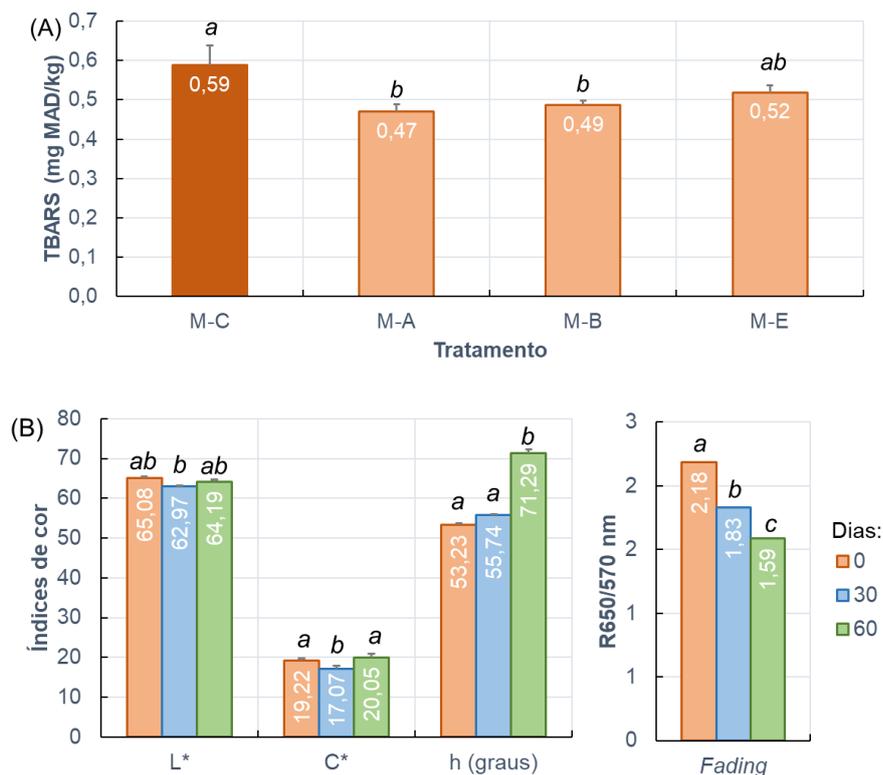
A preferência dos consumidores por produtos com aparência semelhante aos tradicionais, como a cor característica, está de acordo com os relatos da literatura e esse é um dos fatores limitantes na substituição de nitrito em produtos cárneos, uma vez que esse é responsável pela formação da cor característica dos produtos cárneos curados (de OLIVEIRA et al, 2012; GUIMARÃES et al., 2022; PINELLI et al., 2021). De acordo com Pires, Noronha e Trindade (2019), apesar do interesse do consumidor em adquirir produtos mais saudáveis, a maioria não está disposta a abrir mão dos atributos sensoriais tradicionais.

3.3 Estabilidade das mortadelas fatiadas curadas

Nas amostras curadas (M), foi verificado um efeito significativo dos tratamentos da CMS nos valores de TBARS e do tempo de armazenamento nos índices de cor e perda da cor curada (*fading*), medida pela razão R650/750 nm. Os valores de TBARS não foram ($P > 0,05$) afetados pelo tempo de armazenamento, mas as mortadelas curadas M-A e M-B apresentaram valores significativamente iguais e menores do que o controle (M-C), ambos não diferindo das amostras M-E (FIGURA 7A). Ou seja, durante os 60 dias de armazenamento (a 4 °C), os

valores de TBARS não se alteraram e as mesmas diferenças observadas no dia zero (FIGURA 7) foram mantidas.

Figura 7 - Efeitos dos (A) tratamentos da carne mecanicamente separada (CMS) nos valores de TBARS e do (B) tempo de armazenamento (dias) nos índices de cor e perda da cor curada (fading) de mortadelas curadas (adicionadas de nitrito). Tratamentos: mortadela controle (M-C); e com CMS tratada com acetato de eugenila (M-A), bis-eugenol (M-B) ou eugenol (M-E). Luminosidade (L*); Saturação (C*) e Tonalidade (h).



Médias, em cada característica, seguidas de letras distintas (*a-c*) diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Barras representam o erro padrão da média. Fonte: Do autor (2022).

O potencial antioxidante do nitrito contribuiu para que não houvesse diferenças significativas no índice de TBARS durante o período de armazenamento. O nitrito atua como antioxidante em produtos cárneos curados devido à capacidade do óxido nítrico (NO), formado a partir da dissociação do nitrito em solução, de fixar e estabilizar o ferro heme presente nos pigmentos da carne, formando pigmentos nitrosos relativamente estáveis ao processo oxidativo (RAMOS; GOMIDE, 2017). No entanto, um efeito sinérgico na ação antioxidante do nitrito foi observado nas mortadelas contendo CMS tratadas com acetato de eugenila e bis-eugenol. Óleos essenciais, ricos em compostos fenólicos, podem atuar sinérgicamente com nitrito na estabilização oxidativa de produtos cárneos curados, pois também interagem com íons ferro, tornando-os indisponíveis como catalisadores de reações

oxidativas via reações de Fenton (VEGA-HERNÁNDEZ et al., 2017; YANG et al., 2014). A capacidade de interação com íons ferro, de compostos fenólicos, está diretamente relacionada com a quantidade e localização de seus grupamentos oxigenados. O acetato de eugenila e o bis-eugenol apresentam em suas estruturas maior conteúdo de grupamentos oxigenados do que o eugenol, e isso deve ter colaborado para uma maior interação com íons ferro, que contribuiu para redução nos valores de TBARS, quando associados ao nitrito.

Efeitos sinérgicos entre óleos essenciais e nitrito foram relatados por de Oliveira et al. (2012) com combinação de 100 mg/kg de nitrito e 15,60 µL/g de óleo essencial de *Satureja montana* em mortadelas. Šojić et al. (2019) relataram que a combinação de diferentes quantidades de nitrito com óleo essencial de coentro resultou em menores índices de TBARS, durante o período de armazenamento de salsichas. Pinelli et al. (2021) encontraram menores valores nos índices de TBARS em mortadelas curadas contendo óleos essenciais livres e nanoemulsificados em relação ao controle.

Os tratamentos da CMS com o eugenol e seus derivados não afetaram a estabilidade da cor curada das mortadelas, sendo observada uma descoloração das fatias durante o armazenamento refrigerado. Essa descoloração é evidenciada pela diminuição gradual da cor curada (valores de R650/570 nm), denominada *fading*, ao longo do período de armazenamento, saindo de valores próximos a 2,2, considerada uma cor curada excelente (AMSA, 2012), para valores próximos a 1,6, após 60 dias de armazenamento (FIGURA 7B). A degradação da cor curada ocorre por reações de oxidação dos pigmentos heme nitrosos, na presença de luz e oxigênio ou pela diminuição dos níveis de nitrito residual ao longo do período de armazenamento (GUIMARÃES et al., 2022). O pigmento nitrosohemocromo, de cor rosa, formado após o processo de cozimento de produtos curados, é especialmente sensível à luz e oxigênio, bem como a processos oxidativos lipídicos ou proteicos (ŠOJÍĆ et al., 2019, TRINDADE et al., 2008). A exposição de produtos curados à luz e ao oxigênio causa a dissociação do NO do pigmento nitrosohemocromo, que se oxida, resultando em produtos com aparência acastanhada. Esse processo pode ocorrer mesmo na ausência de luz e dentro de embalagens seladas a vácuo; porém, com uma menor taxa de reação (Ramos & Gomide, 2017). Segundo AMSA (2012), a razão R650/570 nm é particularmente útil para indicar embalagens a vácuo com vazamento ou outras condições que promovam a descoloração da cor curada.

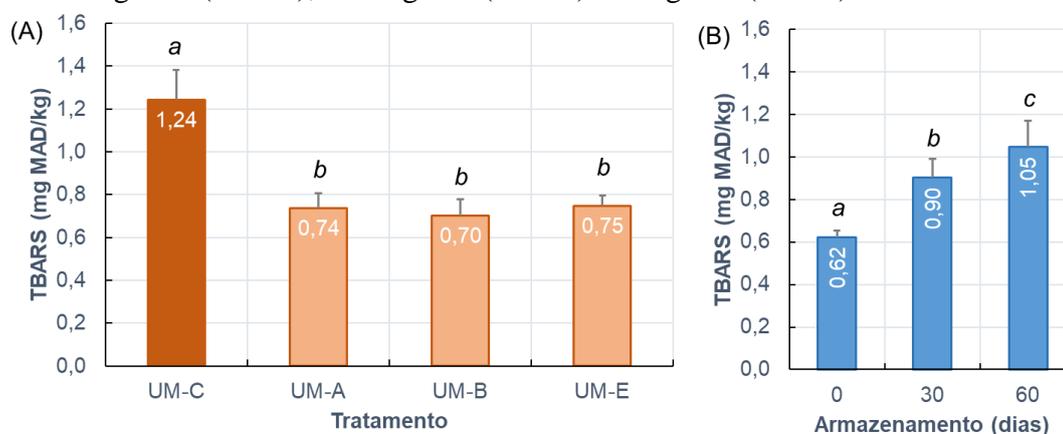
Em relação aos índices de cor, observa-se uma variação nos valores de L^* e C^* das amostras nos 60 dias de armazenamento, enquanto os valores de h , aumentaram significativamente no 60º dia (FIGURA 7B). Essas alterações são condizentes com as

observações de Guimarães et al. (2022) que, ao avaliarem a estabilidade da cor curada de presuntos cozidos em embalagens permeáveis ao oxigênio e à temperatura ambiente para acelerar o processo oxidativo, relataram um grande aumento nos valores de h e nenhuma mudança significativa nos valores de L^* e C^* . Uma vez que o índice de TBARS das amostras permaneceu constante ao longo do armazenamento, essas mudanças na cor curada não foram induzidas pela oxidação lipídica. No estudo de Pinelli et al. (2021), os valores de h também sofreram influência do tempo de armazenamento em mortadelas formuladas com nitrito e óleos essenciais; porém, esses autores observaram uma redução (de aproximadamente 72° para 66°) durante 30 dias de armazenamento, a vácuo e refrigerado (4°C).

3.4 Estabilidade das mortadelas fatiadas não curadas

Para as amostras não curadas (UM), os efeitos dos fatores foram diferentes das curadas. Não houve efeito ($P > 0,05$) da interação, mas foi verificado efeito significativo isolado dos tratamentos da CMS e do tempo de armazenamento nos valores de TBARS, enquanto os índices de cor não se alteraram ($P > 0,05$) com nenhum dos fatores. Assim, as mortadelas não curadas processadas com CMS contendo eugenol, acetato de eugenila e bis-eugenol apresentaram índices de TBARS significativamente menores do que as amostras-controle (FIGURA 8A), mas com comportamento semelhante ao longo do armazenamento refrigerado, em que ficou evidenciado o aumento na formação de aldeídos (FIGURA 8B).

Figura 8 - Efeitos dos (A) tratamentos da carne mecanicamente separada (CMS) e do (B) tempo de armazenamento (dias) nos valores de TBARS de mortadelas não curadas. Tratamentos: mortadela controle (UM-C); e com CMS tratada com acetato de eugenila (UM-A), bis-eugenol (UM-B) ou eugenol (UM-E).



Médias, em cada característica, seguidas de letras distintas ($a-c$) diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Barras representam o erro padrão da média. Fonte: Do autor (2022).

Na ausência do nitrito, o eugenol e seus derivados atuaram como antioxidantes, aumentando a estabilidade oxidativa dos produtos. O mecanismo antioxidante de compostos fenólicos, como eugenol e seus derivados, pode ser preventivo, pela complexação de íons metálicos e/ou estabilização de espécies reativas de oxigênio, ou direto, inibindo a formação dos compostos secundários da peroxidação lipídica pela estabilização de radicais livres e interrupção das reações oxidativas em cadeias (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013; OLSZOWY Et al., 2019). O mecanismo direto de ação antioxidante desses compostos está relacionado com a capacidade dessas moléculas em doar átomos de hidrogênio ao radical, pela dispersão da densidade eletrônica na estrutura após a doação, bem como sua capacidade de alcançar configurações estáveis, com formação de quinonas (CANDIDO JÚNIOR et al., 2022). O eugenol apresenta dois sítios de doação de hidrogênio em sua estrutura (FERREIRA et al., 2019; YILDIZ et al., 2017): a reação de acetilação elimina o sítio da hidroxila fenólica no acetato de eugenila e a dimerização gera quatro sítios de doação de átomos de hidrogênio na molécula de bis-eugenol (FERREIRA et al., 2022-ARTIGO II, submetido à publicação). Esperava-se uma diferenciação no efeito antioxidante dessas moléculas; entretanto, a complexidade da matriz pode ter gerado novos tipos de interações que igualaram os efeitos antioxidante do eugenol e seus derivados em mortadelas não curadas. Atuando como antioxidante, o eugenol e seus derivados retardaram a oxidação lipídica nas amostras não curadas, mantendo os índices de TBARS menores ($0,86 \pm 0,26$ mg MAD/kg) do que as amostras-controle ($1,61 \pm 0,32$ mg MAD/kg) ao final dos 60 dias de armazenamento. Efeito semelhante foi observado por Baldin et al. (2016), em que os compostos fenólicos presentes no extrato de jabuticaba reduziram os valores de TBARS em mortadelas não curadas durante o armazenamento refrigerado (1°C e sem vácuo) no escuro por 15 dias.

As CMS adicionadas de eugenol e seus derivados não influenciaram na cor das mortadelas não curadas, de tom marrom ligeiramente rosado (FIGURA 3) obtida pelo uso do corante carmim de cochonilha. De acordo com Ongaratto et al. (2021), esse corante é estável na temperatura de cozimento de produtos cárneos, mas apresenta instabilidade à luz no período de armazenamento. Essa instabilidade não foi observada no presente estudo, uma vez que não ocorreram diferenças significativas nos parâmetros de cor durante os 60 dias de armazenamento. Baldin et al. (2016) também não observaram variações nos atributos de cor de mortadelas não curada adicionada de 0,06% de carmim de cochonilha ao longo de 15 dias de armazenamento refrigerado. Apesar de não se ter conseguido alcançar uma cor semelhante aos obtidos em produtos curados, o uso de corantes pode ser uma alternativa para melhorar os

atributos de cor desses produtos, ao passo que o eugenol ou seus derivados podem auxiliar na redução das reações oxidativas.

CONCLUSÃO

O eugenol e seus derivados adicionados à CMS utilizada no processamento de mortadelas curadas e não curadas não alteraram as características tecnológicas dos produtos, melhoraram as características sensoriais e não interferiram na formação de cor dos produtos curados e não curados. O acetato de eugenila e o bis-eugenol atuaram sinergicamente com o nitrito de sódio na diminuição da formação de aldeídos em mortadelas curadas. Em mortadelas não curadas, todos os compostos adicionados à CMS apresentaram o mesmo potencial antioxidante. As mortadelas M-A e UM-A apresentaram sabor de cravo menos intenso do que aquelas contendo eugenol e nenhum sabor de cravo-da-índia foi relatado para os tratamentos com bis-eugenol (M-B e UM-B). Durante o período de armazenamento das mortadelas fatiadas, o potencial antioxidante do nitrito contribuiu para que não houvesse diferenças significativas no índice de TBARS e os tratamentos não afetaram a estabilidade da cor curada das mortadelas, e em mortadelas não curadas, o eugenol e seus derivados auxiliaram igualmente na redução das reações oxidativas. Entre os compostos avaliados, o bis-eugenol tem potencial para ser utilizado como antioxidante em matrizes alimentares curadas e não curadas, uma vez que é eficaz no controle da oxidação lipídica sem alterar as características sensoriais do alimento; entretanto, mais estudos são necessários para a otimização e aplicação desse composto em diferentes tipos de alimentos, condições e tempo de armazenamento.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”. Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG); o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). Os autores agradecem à Central de Análise e Prospecção Química da Universidade Federal de Lavras.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram não haver interesse financeiro concorrente.

REFERENCIAS

AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10835-10847, 2013. DOI: 10.1021/jf403496k.

AMSA- Meat color evaluation guide. American Meat Science Association (AMSA), Champaign, IL, 2012. Disponível em: < https://meatscience.org/docs/default-source/publications-resources/hot-topics/2012_12_meat_clr_guide.pdf?sfvrsn=d818b8b3_0>. Acesso em 30 de agosto de 2022.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 272, DE 14 DE MARÇO DE 2019. Estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carnes e produtos cárneos. Disponível em: < https://www.in.gov.br/web/guest/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/67378977/do1-2019-03-18-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-272-de-14-de-marco-de-2019-67378770>. Acesso em 12 de setembro de 2022.

BAK, K. H.; RICHARDS, M. P. Hexanal as a predictor of development of oxidation flavor in cured and uncured deli meat products as affected by natural antioxidants. **Foods**, v. 10, n. 1, p. 152, 2021.

BALDIN, J. C. et al. Microencapsulated jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract added to fresh sausage as natural dye with antioxidant and antimicrobial activity. **Meat Science**, v. 118, p. 15-21, 2016. DOI: 10.1016/j.meatsci.2016.03.016

BALDIN, J. C. et al. Effect of microencapsulated Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract on quality and storage stability of mortadella sausage. **Food Research International**, v. 108, p. 551-557, 2018. DOI:10.1016/j.foodres.2018.03.076.

BITTENCOURT-MERNAK, M. I. et al. Effects of Eugenol and Dehydrodieugenol B from *Nectandra leucantha* against Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Experimental Acute Lung Inflammation. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 8, p. 2282-2294, 2021. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.1c00386.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. Publicado no Diário Oficial da União de 05/04/2000, seção 1, p. 6, 2000. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-sda-4-de-31-03-2000,662.html>>.

CANDIDO JÚNIOR, J. R. et al. Antioxidant activity of eugenol and its acetyl and nitroderivatives: the role of quinone intermediates—a DFT approach of DPPH test. **Journal of Molecular Modeling**, v. 28, n. 5, p. 1-15, 2022. DOI: 10.1007/s00894-022-05120-z.

DA SILVA, F. F. M. et al. Eugenol derivatives: Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial and antioxidant activities. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2018. DOI:10.1186/s13065-018-0407-4.

DE LA VEGA-HERNÁNDEZ, K. et al. Discerning the antioxidant mechanism of rapanone: A naturally occurring benzoquinone with iron complexing and radical scavenging activities. **J. Inorg. Biochem.**, 2017, 170, 134-147. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.02.019.

de OLIVEIRA, T. L. C. et al. Antioxidant effects of *Satureja montana* L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **LWT-Food Science and Technology**. v. 45, p. 204-212, 2012. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.09.006.

DUTRA, M. P. et al. Combined effects of gamma radiation doses and sodium nitrite content on the lipid oxidation and color of mortadella. **Food chemistry**, v. 237, p. 232-239, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.05.108.

FERREIRA, V. R. F.; BELLETE, B. S.; IONTA, M.; PRESSETE, C. G.; GUERREIRO, M. C.; DE CARVALHO, G. C. P.; RAMOS, E. M.; NELSON, D. L.; CARDOSO, M. G. Synthesis of Eugenol Derivatives: Evaluation of the Structural Influence on Oxidative Stability, Antioxidant and Cytotoxic Properties. **Submetido à publicação no Journal of Natural Products**, (2022-ARTIGO II, 108-134 p.)

FERREIRA, V. R. F. et al. Colorimetric, electroanalytical and theoretical evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium aromaticum* L., *Origanum vulgare* L., *Mentha spicata* L. and *Eremanthus erythropappus* M. essential oils, and their major constituents. **New Journal of Chemistry**. v. 43, n. 20, p. 7653-7662, 2019. DOI: 10.1039/C8NJ05893H.

FERREIRA, V.R. F.; OLIVEIRA, C. D.; CAMPOLINA, G. A.; CAETANO, A. R. S.; DE OLIVEIRA PAULA, M. M.; NELSON, D. L.; RAMOS, E. M.; CARDOSO, M. G. Use of eugenol derivatives in the control of lipid oxidation in mechanically separated poultry meat. **Em fase de elaboração para submissão no periodico Food Chemistry**, (ARTIGO III, 140-162 p).

GUIMARÃES, A. S. et al. Characterization of natural curing agents from Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) for their use in clean label restructured cooked meat products. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie [Food science and technology]**, v. 150, n. 111970, p. 111970, 2021. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111970.

GUIMARÃES, A. S. et al. Assessment of Japanese radish derivatives as nitrite substitute on the physicochemical properties, sensorial profile, and consumer acceptability of restructured cooked hams. **Meat Science**, v. 192, p. 108897, 2022. DOI:10.1016/j.meatsci.2022.108897.

HUGHES, E.; COFRADES, S.; TROY, D. J. Effects of fat level, oat fibre and carrageenan on frankfurters formulated with 5, 12 and 30% fat. **Meat Science**, Barking, v. 45, n. 3, p. 273-281, Mar. 1997. DOI:10.1016/S0309-1740(96)00109-X.

JÚNIOR, M. M. et al. Substitution of synthetic antioxidant by curcumin microcrystals in mortadella formulations. **Food chemistry**, v. 300, p. 125231, 2019. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125231.

MACHADO, J. R. et al. Synthesis of eugenyl acetate by immobilized lipase in a packed bed reactor and evaluation of its larvicidal activity. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 114-119, 2017. DOI:10.1016/j.procbio.2017.04.031.

MASSINGUE, A. A. et al. Effect of mechanically deboned poultry meat content on technological properties and sensory characteristics of lamb and mutton sausages. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 31, n. 4, p. 576, 2018. DOI: 10.5713/ajas.17.0471.

MILLER, D. K. et al. Compositional Differences Among Types of Mechanically Separated Chicken and Their Influence on Physicochemical Attributes of Frankfurter-Type Sausages. **Meat and Muscle Biology**, v. 5, n. 1, 2021. DOI: 10.22175/mmb.12294.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial: estudos com consumidores**. Viçosa: Editora UFV, 2013.

OLSZOWY M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 144, p. 135-143, Sep, 2019. DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.09.039.

ONGARATTO, G. C. et al. Cochineal carmine adsorbed on layered zinc hydroxide salt applied on mortadella to improve color stability. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 758-764, 2021. DOI: 10.1016/j.crfs.2021.10.006.

PEREIRA, A. G. T. et al. Effects of the addition of mechanically deboned poultry meat and collagen fibers on quality characteristics of frankfurter-type sausages. **Meat science**, v. 89, n. 4, p. 519-525, 2011. DOI:10.1016/j.meatsci.2011.05.022.

PIKUL, J.; LESZCZYNSKI, D. E.; KUMMEROW, F. A. Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 1309-1313, 1989. DOI: 10.1021/jf00089a022.

PINELLI, J. J. et al. Essential oil nanoemulsions for the control of Clostridium sporogenes in cooked meat product: An alternative?. **LWT**, v. 143, p. 111123, 2021. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111123.

PIRES, M. A.; DE NORONHA, R. L. F.; TRINDADE, M. A. Understanding consumer's perception and acceptance of bologna sausages with reduced sodium content and/or omega-3 addition through conjoint analysis and focus group. **Journal of Sensory Studies**, v. 34, n. 3, p. e12495, 2019. DOI: 10.1111/joss.12495.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Meat quality assessment: fundamentals and methodologies**. Viçosa, MG, Brazil: Editora UFV, 2017.

RESENDE, D. B. et al. Synthesis and in vitro evaluation of peracetyl and deacetyl glycosides of eugenol, isoeugenol and dihydroeugenol acting against food-contaminating bacteria. **Food chemistry**. v. 237, p. 1025-1029, Dec, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.06.056.

RIVERA, N.; BUNNING, M.; MARTIN, J. Uncured-labeled meat products produced using plant-derived nitrates and nitrites: Chemistry, safety, and regulatory considerations. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 29, p. 8074-8084, 2019. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b01826.

SCHRANZ, M. et al. Influence of the chemical structure on the odor qualities and odor thresholds of guaiacol-derived odorants, Part 1: Alkylated, alkenylated and methoxylated derivatives. **Food Chemistry**. v. 232, p. 808-819, 2017. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.04.070.

ŠOJIĆ, B. et al. Coriander essential oil as natural food additive improves quality and safety of cooked pork sausages with different nitrite levels. **Meat science**, v. 157, p. 107879, 2019. DOI: 10.1016/j.meatsci.2019.107879.

TALÓN, E. et al. Encapsulation of eugenol by spray-drying using whey protein isolate or lecithin: Release kinetics, antioxidant and antimicrobial properties. **Food chemistry**. v. 295, p.588-598, Oct, 2019 a. DOI: 0.1016/j.foodchem.2019.05.115.

TALÓN, E. et al. Antioxidant starch-based films with encapsulated eugenol. Application to sunflower oil preservation. **LWT**, v. 113, p. 108290, 2019 b. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108290.

TRINDADE, M. A. et al. Estabilidade oxidativa e microbiológica em carne de galinha mecanicamente separada e adicionada de antioxidantes durante período de armazenamento a-18° C. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 160-168, 2008. DOI: 10.1590/S0101-20612008000100023.

YANG, A. H. et al. Spectroscopic and electrochemical studies on the evaluation of the radical scavenging activities of luteolin by chelating iron. **Rsc Advances**, v. 4, n. 48, p. 25227-25233, 2014. DOI: 10.1039/C4RA01396D.

YILDIZ, G. et al. Electrochemical oxidation mechanism of eugenol on graphene modified carbon paste electrode and its analytical application to pharmaceutical analysis. **Talanta**, [S.I.], v. 173, p. 1-8, May., 2017. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.05.056.

ZHANG, H. et al. The application of clove extract protects Chinese-style sausages against oxidation and quality deterioration. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 37, n. 1, p. 114, 2017. DOI: 10.5851/kosfa.2017.37.1.114.

ZHANG, H.; WU, J.; GUO, X. Effects of antimicrobial and antioxidant activities of spice extracts on raw chicken meat quality. **Food Science and Human Wellness**. v. 5, n. 1, p. 39-48, Mar, 2016. DOI: 10.1016/j.fshw.2015.11.003.

CONCLUSÕES GERAIS

As modificações estruturais do eugenol para a formação de acetato de eugenila e bis-eugenol com alta pureza e rendimento seguem protocolos simples e de baixo custo e fornecem derivados com características distintas do composto de partida. As propriedades antioxidantes *in vitro* variaram conforme a estrutura dos compostos avaliados, com o acetato de eugenila apresentando menor potencial antioxidante que os demais compostos, e o bis-eugenol sendo mais eficiente em manter a estabilidade oxidativa de óleos vegetais e apresentando maior potencial redutor. As modificações estruturais contribuíram para a formação de compostos menos tóxicos que o eugenol. Em CMS de frango, todos os compostos exibiram o mesmo potencial antioxidante e mantiveram a estabilidade oxidativa da matriz durante o período de armazenamento, na menor concentração avaliada, e não alteraram a cor característica das CMS. O bis-eugenol é estável na matriz cárnea, mas o acetato de eugenila interage com os compostos presentes na CMS, voltando a eugenol. O eugenol e seus derivados não alteraram as características tecnológicas dos produtos cárneos, melhoraram as características sensoriais e não interferiram na formação da cor curada, em mortadelas curadas. O acetato de eugenila e o bis-eugenol atuaram sinergicamente com o nitrito de sódio na preservação da oxidação lipídica. Os compostos não se distinguiram entre si quando adicionados na CMS utilizada para processamento de mortadelas não curadas, e foram capazes de retardar a oxidação lipídica e não alteraram a pigmentação do corante utilizado. Os produtos contendo acetato de eugenila apresentaram sabor de cravo menos intenso do que aqueles contendo eugenol e nenhum sabor de cravo-da-índia foi relatado para os produtos contendo bis-eugenol. O derivado sintético bis-eugenol é uma boa opção de antioxidante para a indústria, uma vez que apresenta potencial antioxidante na matriz alimentícia, sem alterações sensoriais e possui menor citotoxicidade que o eugenol.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por produtos naturais em relação aos antioxidantes utilizados atualmente vem aumentando cada vez mais, devido à preocupação da sociedade com a saúde do consumidor. Isso se deve à capacidade de essas substâncias naturais e de seus derivados sintéticos apresentarem atividades biológicas comprovadas, sendo uma alternativa para a obtenção de compostos bioativos, com alto potencial antioxidante.

Os resultados sobre a matriz inicial, isto é, um dos componentes presentes no óleo essencial de cravo-da-índia (eugenol) são inovadores e valiosos, trazendo a síntese dos compostos acetato de eugenila e bis-eugenol e suas atividades antioxidantes na conservação de produtos cárneos. A disseminação da pesquisa para a sociedade será divulgada na forma de artigos científicos, podendo indicar a viabilidade da aplicação dos produtos obtidos em matrizes alimentares altamente oxidáveis, no controle da oxidação lipídica.

Desta maneira, neste projeto há uma inovação para a área de produtos naturais, com aplicações direta na ciência dos alimentos com grandes impactos, tanto científico como tecnológico, no desenvolvimento de antioxidantes mais saudáveis e com menor toxicidade.