

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**RANGEL ZAGHETI DOS REIS**

**EXTRATO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) COMO ANTIOXIDANTE E  
ANTIMICROBIANO NATURAL EM PRODUTO CÁRNEO CRU CURADO**

**MEDIANEIRA**

**2022**

**RANGEL ZAGHETI DOS REIS**

**EXTRATO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) COMO ANTIOXIDANTE E  
ANTIMICROBIANO NATURAL EM PRODUTO CÁRNEO CRU CURADO**

**Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract as a natural antioxidant  
and antimicrobial in cured raw meat product**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Profa. Dra. Marinês Paula Corso

Coorientador(a): Profa. Dra. Rosana Aparecida da Silva Buzanello

**MEDIANEIRA**

**2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



RANGEL ZAGHETI DOS REIS

**EXTRATO DE ERVA-MATE (ILEX PARAGUARIENSIS) COMO ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO  
NATURAL EM PRODUTO CÁRNEO CRU CURADO**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologia De Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Alimentos.

Data de aprovação: 22 de Dezembro de 2022

Dra. Marines Paula Corso, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Deisy Alessandra Drunkler, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Tahis Regina Bau, Doutorado - Instituto Federal Santa Catarina - Ifsc

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 22/12/2022.

Dedico este trabalho aos meus pais, por sempre  
me apoiarem e sempre acreditarem nos meus  
sonhos, muito obrigado.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, onipotente, onipresente e onisciente, de generosidade infinita, símbolo mor de justiça e erudição, à Ele toda a honra e glória, pelos séculos dos séculos, assim seja.

Agradeço também aos meus pais, por serem tão grande esteio e lastro para mim, por tanta paciência e compreensão que sempre tiveram em todos os momentos da minha vida.

Deixo também um agradecimento especial a todo corpo docente do programa, que dedicam suas vidas com tanto esmero em prol da educação e da ciência. E em especial aos envolvidos nesse estudo, minha orientadora Dr(a) Marinês Paula Corso, coorientadora Dr(a) Rosana Aparecida da Silva Buzanello. E também para a professora Dr(a) Cristiane Canan, pela importante contribuição dada nesse projeto.

Aos meus amigos, que da mesma forma deram tanto apoio e companheirismo nos momentos desafiadores passados nesse tempo, cabendo aqui um agradecimento especial a Elisandra Vanessa de Moura, por novamente contribuir com tanto ao longo dessa trajetória.

À UTFPR, todo corpo de servidores da universidade, que também dedicam suas vidas pela educação, em especial aos envolvidos na CEANMED (Central Analítica do Campus Medianeira) e ao Laboratório Central Analítica (LABCA), que foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho

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

O homem não teria alcançado o possível se, repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível.

Max Weber

## RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é reconhecida pelo teor de compostos bioativos, apresentando elevada atividade antioxidante, com impacto positivo à saúde do consumidor. Devido a susceptibilidade à oxidação, os produtos cárneos demandam a aplicação de antioxidantes, sendo sugeridos estudos buscando avaliar a obtenção e aplicação de antioxidantes naturais, em substituição aos sintéticos. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade da extração assistida por ultrassom, dos compostos antioxidantes constituintes da erva-mate, para posterior aplicação desse extrato em substituição total de antioxidantes sintéticos em linguiça toscana. Os parâmetros aplicados na extração foram temperatura de 70 °C, frequência de 37 kHz, potência de 80% de 580 W e um tempo de 60 min, utilizando-se diferentes solventes extratores (solução hidroetanólica 30% v/v, solução hidroetanólica acidificada com 1% de ácido fosfórico v/v e solução de ácido fosfórico 1% v/v). As respostas avaliadas nos extratos foram teor de ácido clorogênico, cafeína, teor de compostos fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP, bem como a atividade antimicrobiana, concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bacteriana mínima (MCB), para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Os valores para ácido clorogênico e cafeína variaram, respectivamente, de 3,76 a 7,04 g 100 g<sup>-1</sup> e de 1,94 a 3,43 g 100 g<sup>-1</sup>. Com relação a atividade antioxidante, os resultados para a caracterização dos compostos fenólicos totais ficou compreendida entre 9,76 e 12,89 g EAG 100 g<sup>-1</sup>, para ABTS entre 58,60 e 75,97 g ET 100 g<sup>-1</sup>, para DPPH variaram de 24,94 e 30,22 g ET 100 g<sup>-1</sup>, para FRAP de 67,49 a 85,53 g E Fe(II) 100 g<sup>-1</sup> e para flavonoides de 236,21 a 646,28 mg EQ 100 g<sup>-1</sup>. Para atividade antimicrobiana, os valores de MIC variaram de 3,13 a 12,50 mg mL<sup>-1</sup> para os microrganismos testados, e MBC variando de 12,5 a 25 mg mL<sup>-1</sup>. Com base nos resultados encontrados, definiu-se que o extrato a ser empregado na formulação de linguiça toscana foi o obtido com solvente hidroetanólico (30%) sem acidificação, da amostra do município de Cascavel/PR a escolhida em comparação com a de Santa Maria do Oeste/PR. O extrato de erva-mate foi seco por *spray dryer* e aplicado como antioxidante natural em linguiças tipo toscana produzidas com concentrações de 0,5% m/m (F1) e 2% m/m (F2) de extrato, comparadas à uma formulação controle (FC) com 0,5% de eritorbato de sódio. As linguiças produzidas foram caracterizadas quanto à composição centesimal, parâmetros físico-químicos, oxidativos e perfil de ácidos graxos. As amostras não diferiram quanto a composição centesimal e atenderam aos padrões recomendados pela legislação vigente. A medida instrumental de cor confirmou que a adição do extrato de erva-mate resultou em amostras com tonalidade mais escura e esverdeada, por meio da redução dos parâmetros L\* e a\* e maior valor do parâmetro b\*. A análise de TBARS demonstrou que a aplicação do extrato de erva-mate manteve a estabilidade oxidativa nas linguiças, quando comparadas à padrão, não diferindo significativamente ao longo dos 30 dias de armazenamento sob refrigeração. No perfil de ácidos graxos, diferenças quanto ao conteúdo de ácidos graxos insaturados puderam ser observados em 30 dias de armazenamento, sendo superiores na amostra F2 em comparação as demais, o que sugere que esta concentração de extrato pode ter contribuído para a redução da oxidação destes ácidos graxos.

Palavras-chave: erva-mate; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana; linguiça toscana; oxidação lipídica.

## ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) is recognized for its high content of bioactive compounds, and consequent antioxidant activity, presenting a positive impact on consumer health. Due to their susceptibility to oxidation, meat products require the application of antioxidants, and studies are suggested to evaluate the obtainment and application of natural antioxidants, replacing synthetic ones. Thus, the aim of this study was to evaluate the feasibility of ultrasound-assisted extraction of the constituent antioxidant compounds of yerba mate, for subsequent application of this extract in total replacement of synthetic antioxidants in Tuscan sausage. The parameters applied in the extraction were a temperature of 70 °C, frequency of 37 kHz, power of 80% of 580 W, and a time of 60 min, using different extractor solvents (30% hydroethanolic solution, acidified hydroethanolic solution with 1% phosphoric acid and 1% phosphoric acid solution). The responses evaluated in the extracts were chlorogenic acid content, caffeine, total phenolic compounds content, flavonoids, antioxidant activity by ABTS, DPPH, and FRAP methods, as well as antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bacterial concentration (MBC), for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Klebsiella pneumoniae*. The values for chlorogenic acid and caffeine varied, respectively, from 3.76 to 7.04 g 100 g<sup>-1</sup> and from 1.94 to 3.43 g 100 g<sup>-1</sup>. Regarding antioxidant activity, the results for the characterization of total phenolic compounds ranged between 9.76 and 12.89 g EAG 100 g<sup>-1</sup>, for ABTS ranged from 58.60 to 75.97 g ET 100 g<sup>-1</sup>, for DPPH from 24.94 to 30.22 g ET 100 g<sup>-1</sup>, for FRAP from 67.49 to 85.53 g E Fe(II) 100 g<sup>-1</sup> and finally, the levels for flavonoid analysis varied from 236.21 to 646.28 mg EQ 100 g<sup>-1</sup>. For antimicrobial activity, MIC values ranged from 3.13 to 12.50 mg mL<sup>-1</sup> for the microorganisms tested, and MBC ranging from 12.5 to 25 mg mL<sup>-1</sup>. Based on the results found, it was defined that the extract to be used in the formulation of Tuscan sausage was obtained with hydroethanolic solution (30%) without acidification, from the sample of Cascavel/PR. The yerba mate extract was spray-dried and applied as a natural antioxidant in Tuscan sausages produced with concentrations of 0.5% m/m (F1) and 2% m/m (F2) of extract, compared to a formulation control (FC) with 0.5% sodium erythorbate. The sausages produced were characterized in terms of chemical composition, physicochemical and oxidative parameters, and fatty acid profile. The samples did not differ in terms of proximate composition and are in accordance with the standards recommended by current legislation. The instrumental color measurement confirmed that the addition of yerba mate extract resulted in samples with a darker and greener hue, through the reduction of the L\* and a\* parameters and a higher value of the b\* parameter. The TBARS analysis showed that the application of yerba mate extract maintained the oxidative stability in the sausages, when compared to the standard one, not differing significantly over the 30 days of storage under refrigeration. In the fatty acid profile, differences in the content of unsaturated fatty acids could be observed after 30 days of storage, being higher in the F2 sample compared to the others, which suggests that this extract concentration may have contributed to the reduction of oxidation of these fatty acids.

Keywords: yerba mate; antioxidant activity; antimicrobial activity; Tuscan sausage; lipid oxidation.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Folhas, flores e árvore da erva-mate.....	23
Figura 2 - Área nativa de <i>Ilex paraguariensis</i> . ....	23
Figura 3 - Fluxograma do processo produtivo das formulações de linguiça toscana.....	43
Figura 4 - Massa homogeneizada após adição dos antioxidantes .....	44
Figura 5 - Formulações de linguiça toscana, controle (com antioxidante comercial), F1 com 0,5 e F2 com 2% de extrato seco de erva-mate respectivamente, após embutimento, embalagem a vácuo (a) e cozimento (b) .....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de extração de compostos bioativos aplicadas em amostras de erva-mate. ....	36
Tabela 2 - Gradiente da proporção da fase móvel com relação ao tempo. ....	37
Tabela 3 - Formulação base para elaboração de linguiça toscana.....	42
Tabela 4 - Resultados de média e desvio padrão da análise granulométrica para as amostras de erva-mate de Cascavel e Santa Maria do Oeste, no Paraná.....	48
Tabela 5 - Teores de compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos de erva-mate colhida em Cascavel e Santa Maria do Oeste no Paraná, extraídos com diferentes solventes. ....	49
Tabela 6 - Resultados para caracterização de atividade antimicrobiana e bacteriostática de extrato hidroetanólico de erva-mate e do levofloxacino.....	53
Tabela 7 - Composição centesimal (g 100 g <sup>-1</sup> ) de linguiça toscana elaborada cm extrato de erva mate e antioxidante comercial.....	55
Tabela 8 - Análise colorimétrica para as diferentes formulações para diferentes intervalos de tempo, e ainda, após cocção.....	57
Tabela 9 - pH das formulações de linguiça toscana com adição de extrato de erva mate, durante vida útil e após cozimento.....	58
Tabela 10 - Resultado para análise de TBARS, realizada em diferentes intervalos de tempo.....	60
Tabela 11 - Perfil de ácidos graxos das amostras de linguiça tipo toscana adicionadas de diferentes antioxidantes, no tempo zero de armazenamento...	61
Tabela 12 - Perfil de ácidos graxos das amostras de linguiça do tipo toscana adicionadas de diferentes antioxidantes no tempo 30 dias de armazenamento.....	62

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations.
Kg/hab	Quilograma por habitante.
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal.
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias.
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade.
BHA	Butil Hidroxianisol.
°C	Graus Celsius.
Km <sup>2</sup>	Quilometro quadrado.
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
HCl	Ácido Clorídrico.
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
ELSD	Detectores Evaporativos com Espelhamento de Luz.
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência.
CG	Cromatografia gasosa.
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila.
TPTZ	2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina.
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico).
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.
MIC	Concentração Inibitória Mínima.
m	Metro.
IAL	Instituto Adolfo Lutz.
kHz	Quilo hertz.
W	Watt
v/v	Volume por volume.
g m <sup>-2</sup>	Gramas por metro quadrado.
5-ACQ	Ácido 5-cafeoilquínico.
FRAP	Ferric reducing ability power.
Nm	Newton metro.

UV-Vis	Ultravioleta Visível.
mg L <sup>-1</sup>	miligrama por litro.
μL	microlitro.
Mm	milímetro.
EQ	Equivalente de Trolox.
μMol L <sup>-1</sup>	micromol por litro.
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	15
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	15
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
<b>3.1 Proteína Animal, Carne Suína e Produtos Cárneos</b> .....	16
<b>3.2 Oxidação em Carnes</b> .....	18
<b>3.3 Conservantes Sintéticos e Naturais em Alimentos</b> .....	19
<b>3.4 Insumos de Origem Natural em Alimentos</b> .....	21
<b>3.5 Erva Mate</b> .....	22
<b>3.6 Extração De Compostos Bioativos</b> .....	26
<b>3.7 Isolamento e caracterização de compostos bioativos</b> .....	29
<b>3.8 Determinação da Atividade Antioxidante</b> .....	30
3.8.1 DPPH .....	31
3.8.2 FRAP .....	31
3.8.3 ABTS .....	31
3.8.4 Compostos Fenólicos .....	32
3.8.5 Flavonoides .....	32
<b>3.9 Propriedades Antimicrobianas</b> .....	33
3.9.1 Caracterização da Atividade Antimicrobiana .....	34
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
<b>4.1 Material</b> .....	35
<b>4.2 Métodos</b> .....	35
4.2.1 Caracterização das Amostras .....	35
4.2.2 Obtenção dos extratos .....	36
4.2.3 Determinação Dos Teores De Compostos Bioativos E Atividade Antioxidante Dos Extratos .....	37
4.2.3.1 Determinação de 5-ACQ e cafeína .....	37
4.2.3.2 Determinação de compostos fenólicos totais .....	38
4.2.3.3 Determinação de flavonoides totais .....	38
4.2.3.4 Captura do radical livre DPPH .....	39
4.2.3.5 Captura do radical ABTS .....	39
4.2.3.6 Poder de redução pelo método FRAP ( <i>Ferric Reducing Ability Power</i> ) .....	40
4.2.4 Secagem dos extratos e avaliação do teor de 5-ACQ e cafeína do extrato seco .....	40

4.2.5 Atividade Antimicrobiana do Extrato Seco de Erva-mate .....	41
4.2.6 Aplicação dos Extratos de Erva-mate em Linguiça Frescal.....	42
4.2.6.1 Elaboração das formulações .....	42
4.2.6.2 Análises físico-químicas das formulações.....	44
4.2.6.3 Perda de peso no cozimento .....	45
4.2.6.4 Colorimetria .....	45
4.2.6.5 Oxidação lipídica .....	46
4.2.6.6 Determinação do perfil de ácidos graxos das amostras .....	46
4.2.7 Análise dos Dados .....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1 Compostos Bioativos, Atividade Antioxidante E Antimicrobiana Dos Extratos De Erva-Mate .....</b>	<b>48</b>
<b>5.2 Atividade Antimicrobiana dos Extratos de Erva-mate .....</b>	<b>53</b>
<b>5.3 Aplicação Do Extrato De Extrato Hidroetanólico 30% De Erva-Mate Em Produto Carneiro Cru .....</b>	<b>54</b>
5.3.1 Composição Centesimal Das Formulações De Linguiça Toscana .....	55
5.3.2 Perda De Peso Das Amostras No Cozimento .....	56
5.3.3 Alterações na Cor das Amostras com Uso do Extrato de Erva-Mate Durante Vida Útil e Após Cozimento.....	56
5.3.4 Alterações do pH das Amostras Durante Vida Útil e Após Cozimento ....	58
5.3.5 Estabilidade Oxidativa Das Formulações De Linguiça Toscana Controle E Adicionadas De Extrato De Erva-Mate Durante Vida Útil .....	59
5.3.6 Perfil De Ácidos Graxos .....	61
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A carne é uma importante integrante da dieta em humanos desde a antiguidade, principalmente pelo seu importante valor nutricional, sendo fonte notável de proteínas, lipídios, minerais e vitaminas (JIANG; XIONG, 2016). Uma das principais causas de alterações de qualidade em produtos cárneos é a oxidação, tanto lipídica quanto proteica, essas reações devem ser controladas durante todas as etapas do processamento, mas em geral, as maiores alterações ocorrem durante o armazenamento (GONZALEZ *et al.*, 2008; AMANY; SHAKER; ABEER, 2012; AHMAD *et al.*, 2015). Tais reações causam diversas alterações no perfil sensorial do produto, causando mudanças indesejadas em propriedades como sabor, cor, textura e alterações do valor nutricional, além disso, o processo de oxidação pode ser responsável pelo desenvolvimento de substâncias nocivas à saúde humana (NOVELLO; POLLONIO, 2013; PRETE *et al.*, 2020). Assim, o uso de antioxidantes faz-se necessário para a conservação de produtos cárneos.

Mesmo com a grande importância do emprego de agentes antioxidantes sintéticos em produtos cárneos, fundamentalmente para redução da incidência dessas reações deteriorantes, alguns estudos têm demonstrado um efeito nocivo à saúde humana, principalmente como agente carcinógeno (HONORATO *et al.*, 2013). Conquanto, diversas plantas, capim limão, uva e romã por exemplo, têm sido estudadas com o objetivo de caracterizar os compostos bioativos com potencial antioxidante (BOEIRA *et al.*, 2018; ZAGO *et al.*, 2020).

Em geral, quando se refere a compostos bioativos, são bons exemplos de constituintes desse grupo os seguintes compostos químicos: flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides; triterpenos; sesquiterpenos, taninos e ligninas (CAROCHO *et al.*, 2016; RAHMAN, 2007).

O Brasil, com base nas suas características climáticas e geográficas, é o país do mundo com maior biodiversidade genética, com cerca de 55 mil espécies diferentes já catalogadas (ALBAGLI, 2010), e, além disso, tem grande tradição desde os tempos antigos, na utilização de plantas como tratamentos medicinais, costume esse que é carregado pelas gerações.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta nativa do clima subtropical da região sul da América do Sul, principalmente nas regiões norte e nordeste da Argentina, sul do Brasil e leste do Paraguai. O consumo de erva-mate é difundido por

conta de hábitos dos antigos povos nativos da região, isso a torna uma planta com grande importância regional (HECK; DE MEJIA, 2007; ZANOELO; BENINGÁ; RIBEIRO, 2009). Outro aspecto que contribui para a importância regional da erva-mate é o fato de seu consumo poder ser dado por diversas formas (infusão a frio, infusão a quente, tostada, repousada, fresca) se tornando assim, tão tradicional quanto o chá (*Camelia sinensis*) é para os europeus e asiáticos, ou o café para os estadunidenses e europeus (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016).

Um dos aspectos relevantes no estudo da obtenção de compostos bioativos são os parâmetros utilizados na etapa de extração, tais como tempo, temperatura, solvente, emprego de ultrassom, sendo que a composição desses fitoquímicos podem variar conforme as condições empregadas na extração (BISOGNIN *et al.*, 2019; XYNOS *et al.*, 2012). Isso posto, é notável a importância do controle do processo de extração, permitindo a otimização com relação a utilização de solventes menos agressivos ao meio ambiente e a saúde do consumidor, além de reduzir a quantidade empregada desse solvente (HERRERO *et al.*, 2010), além ainda de tornar viável a obtenção de um extrato com maiores teores de compostos bioativos (SUN; LIU; WANG, 2011).

Assim sendo, estudos visando obtenção de extratos de plantas como erva-mate com atividade antioxidante e antimicrobiana para aplicação em produtos cárneos podem propiciar um produto alternativo aos antioxidantes sintéticos, uma opção mais natural de encontro à demanda dos consumidores por produtos mais saudáveis.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a viabilidade de extrato de erva-mate, obtido por extração hidroetanólica assistida por ultrassom, como antioxidante em linguiça frescal tipo toscana.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar amostras de erva-mate de duas procedências, Cascavel/PR e Santa Maria do Oeste/PR quanto a umidade, cor e granulometria.
- Obter extratos da erva-mate via extração assistida por ultrassom avaliando o efeito de diferentes solventes na eficiência da obtenção de compostos bioativos e atividade antioxidante dos extratos de erva-mate;
- Avaliar as propriedades antimicrobianas dos extratos obtidos para os micro-organismos *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.
- Aplicar os extratos de erva-mate em linguiça tipo toscana, em substituição aos antioxidantes sintéticos;
- Avaliar a composição centesimal dos produtos elaborados;
- Avaliar o perfil de ácidos graxos das amostras após elaboração e alterações que possam ocorrer durante a vida útil de 30 dias sob refrigeração;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos nos produtos elaborados, por meio da avaliação da oxidação lipídica durante 30 dias de armazenamento sob refrigeração.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Proteína animal, carne suína e produtos cárneos

A carne é um alimento de destaque na dieta humana desde a antiguidade, principalmente pelo fato de ser rica nutricionalmente, sendo fonte relevante de proteínas, gorduras, minerais e vitaminas (JIANG; XIONG, 2016).

De acordo com a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) a carne suína é a segunda mais consumida do mundo. Em 2019, essa matriz respondeu por 32,49% de toda proteína animal consumida no mundo, *versus* 39,31 e 21,41% para aves e carne bovina, respectivamente (FAO, 2020).

É notável o crescimento da demanda por carne suína nas últimas décadas, principalmente pela mudança dos padrões de consumo, percebido pelo crescimento do poder aquisitivo da população dos países em desenvolvimento. A carne suína, junto com a carne de aves, são as principais causadoras do crescimento do setor pecuário. A produção suína é percebida a nível global, apenas não em regiões em que são envolvidos aspectos religiosos e culturais (FAO, 2020).

A China é o maior produtor de carne suína à nível mundial, sendo que no ano de 2019 foi responsável pela produção de 42.550 milhões de toneladas. A União Europeia foi responsável pela produção de 23.935 milhões de toneladas, e, em terceiro lugar, Estados Unidos, com uma produção de 12.542 milhões de toneladas, o Brasil ocupa o quarto lugar nessa lista. A produção nacional, para o ano de 2021, chegou a 4,701 milhões de toneladas, sendo que vem aumentando ano a ano. Desse total, 75,8% da produção foi destinada ao mercado interno, e 24,2% direcionado ao exterior. Existe ainda um perceptível aumento no consumo pela população, em 2007 eram consumidos 14,1 kg/habitante, e em 2021 esse número saltou para 16,7 kg/hab. O abate de suínos no Brasil é predominantemente realizado na região Sul, sendo os três maiores produtores, Santa Catarina (51,63%), Paraná (13,99%) e Rio Grande do Sul (26,72%) (ABPA, 2020).

Os indicadores de qualidade da carne suína são responsáveis pelo sucesso no mercado. A qualidade tecnológica pode ser definida por fatores como raça, genótipo, manejo pré-abate, atordoamento adequado além do método de abate. Já os atributos de qualidade, como o teor de gordura, estabilidade oxidativa e uniformidade,

são afetados principalmente pelo genótipo e pela estratégia de alimentação (KEENAN, 2015).

A composição química das carnes depende de diversos fatores, tais como a espécie, raça, sexo, dieta, técnica de abate, formas de fracionamento da carcaça, entre outros, dificultando assim, a caracterização química desses constituintes. Porém, alguns parâmetros pouco variam de uma amostra para a outra, como por exemplo, em geral, de 60 a 80% dos tecidos musculares (carnes) são constituídos por água, de 15 a 25% por proteína, e o restante completado por lipídios, minerais, pigmentos e vitaminas (EMBRAPA, 2002).

Diversos são os benefícios relacionados à nutrição humana percebidos a partir do consumo de carne suína, possuindo um alto valor proteico em sua constituição, inclusive com a presença de aminoácidos essenciais. A gordura da carne suína, tanto aparente, quanto intramuscular, é também uma alta fonte energética (FAO, 2020).

Os minerais que constituem a carne suína, em geral, são o fósforo, selênio, sódio, zinco, potássio, cobre, ferro e magnésio, além de alguns outros micronutrientes, como vitaminas, B6, B12, tiamina, niacina, riboflavina e ácido pantotênico. Micronutrientes esses que são muito importantes para a dieta humana, tanto em indivíduos jovens como em adultos (FAO, 2020).

Afora as propriedades nutricionais, outros bons atributos também estão presentes na carne suína, como características sensoriais, tanto para aparência, cor, textura, sabor e odor, tornando assim a carne um produto mais atrativo aos consumidores (EMBRAPA, 2002).

Ainda há que se considerar que o consumo da carne suína se dá na maior parte na forma de produtos industrializados. Dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) de 2015 mostravam que apenas 11% do consumo de carne suína interno se dá na forma in natura, enquanto 89% é na forma de produtos industrializados (ABPA, 2015).

As linguiças frescas são um dos tipos de produtos processados à base de carne suína com consumo mais difundido pelo mundo (SILVEIRA *et al.*, 2014), e, no Brasil, as características desse tipo de produto são definidas pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) como: "...produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionados ou não de tecidos adiposos,

ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, e submetido ao processo tecnológico adequado” (BRASIL, 2000).

Ainda segundo o regulamento, as linguiças podem ser classificadas conforme o tipo de processamento e o tipo da formulação. Linguiça toscana é então caracterizada como “produto cru e curado obtido exclusivamente de carnes suína, adicionada de gordura suína e outros ingredientes” (BRASIL, 2000).

Um outro aspecto importante que é definido pelo RTIQ é o padrão de composição do produto, o qual, resumidamente estabelece que o produto deve ter um teor máximo de 70% de umidade, teor máximo de gordura de 30%, teor mínimo de proteína de 12% e um valor máximo de 0,1% de cálcio em base seca (BRASIL, 2000).

### **3.2 Oxidação em carnes**

A oxidação em alimentos é uma das principais formas de deterioração, causando consequências envolvendo desde os micronutrientes, até os macronutrientes, como carboidratos, lipídios e as proteínas. Por consequência dessa reação, as alterações mais notadas são, alteração de cor, destruição de vitaminas, alterações negativas das propriedades sensoriais, tanto odor quanto sabor, e, por fim, alterações na estrutura física do alimento, causando assim perda de textura (ARAÚJO, 2008; SHAH; BOSCO; MIR, 2014).

A oxidação lipídica é conhecida por ser uma das principais formas de deterioração de carnes e seus derivados, isso se dá pela elevada biodisponibilidade deste macronutriente, essas reações podem iniciar nos músculos dos animais quando ainda vivos, aumentando após abate, principalmente por conta de mudanças promovidas pelo ambiente, além da perda da capacidade antioxidante natural (SHAH; BOSCO; MIR, 2014), com a redução da disponibilidade de agentes antioxidantes nos tecidos, os lipídios e as proteínas tornam-se mais suscetíveis à ação dos radicais livres, que são as espécies químicas que em geral são as causadoras das reações oxidativas (AMARAL; SOLVA; LANNES, 2018).

Alguns parâmetros físicos são interferentes diretos às reações oxidativas, tais como acesso à luz, oxigênio, temperatura externa, composição química dos tecidos e o processamento tecnológico empregado, que podem expor a integridade da matriz, colocando as membranas lipídicas em contato com íons metálicos, facilitando assim as interações pró-oxidativas (KIM; CHO; HAN, 2013).

Reações de oxidação, em geral, se dão pela transferência de elétrons de um átomo de uma substância para outra (ARAÚJO, 2008), sendo que podem se dar por diversas vias distintas, tais como, autooxidação a partir da atuação dos radicais livres, foto-oxidação, oxidação enzimática e, por fim, a oxidação térmica (SHAHIDI, 2016). Tais reações podem sofrer influência de alguns fatores, como o perfil dos ácidos graxos constituintes, disponibilidade de oxigênio, teor de ácidos graxos livres, umidade e exposição térmica (ARAÚJO, 2008).

Oxidação térmica é então, o processo oxidativo resultante de uma reação envolvendo oxigênio e altas temperaturas, como envolve emprego de grande quantidade de calor, esse tipo de reação pode ocorrer tanto em gorduras insaturadas como saturadas, sendo percebida a formação de peróxidos, epóxidos, hidróxidos e cetonas como produtos dessa reação, compostos esses que são notavelmente nocivos à saúde humana (ARAÚJO, 2008).

A foto-oxidação é o processo oxidativo que se dá pela exposição dos ácidos graxos insaturados à luz, oxigênio e fotossensibilizadores (mioglobina, riboflavina, clorofila, entre outros) que são responsáveis por absorver energia luminosa em comprimento de onda na faixa visível, e em seguida transferem para o oxigênio tripleto ( $O_2$ ), gerando o estado singleto ( $O_2$ ), composto esse que passa a ser responsável por reagir com as ligações duplas dos ácidos graxos insaturados, formando hidroperóxidos diferentes dos que se observam em ausência de luz, podendo, posteriormente, se a reação prosseguir, gerar aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos, caracterizando um mecanismo alternativo que independe da formação ou presença dos radicais livres (ARAÚJO, 2008; SHAHIDI, 2016).

Em suma, na iniciação são gerados radicais livres, na propagação, os radicais reagem com mais ácidos graxos insaturados, formando hidroperóxidos lipídicos e mais radicais livres, que deverão entrar novamente na reação, e a terminação é quando os radicais livres começam a reagir entre si, produzindo novas espécies não radicais (PERUMULLA; HETTIARACHCHY, 2011; SHAHIDI, 2016; ARAÚJO, 2008).

### **3.3 Aditivos sintéticos e naturais em alimentos**

O processo de conservação de alimentos pode, a longo prazo, ter efeitos indesejados, dependendo da substância e do tempo de exposição ao conservante. Em consequência desse impacto negativo, é possível notar um aumento na demanda

por alimentos frescos minimamente processados, porém altamente perecíveis, conservados por processos físicos menos invasivos, como o emprego de calor, e embalagens mais tecnológicas ou ainda com atmosfera modificada (RAHMAN, 2007).

Alguns exemplos de conservantes sintéticos amplamente utilizados pela indústria já há algum tempo são, ácido benzoico, ácido ascórbico, sorbatos, ácido propiônico, nitritos e parabenos, confiáveis e largamente empregados na indústria de alimentos com resultados diretos no controle microbiano (BRUL; COOTE, 1999). Além desses, outro conservante muito utilizado para cosméticos, fármacos e alimentos é o butil hidroxianisol (BHA), que se caracteriza por sua excelente atividade antioxidante e modesta atividade antimicrobiana, com maior efeito contra fungos e bactérias gram positivas, e menor atividade contra bactérias gram negativas (ROWE *et al.*, 2012).

Porém, a utilização de BHA tem sido questionada por sua notável toxicidade, já que se percebe efeito genotóxico causando danos ao estômago, cólon, bexiga e cérebro, originando células neoplásicas quando exposto por longos tempos (POLÔNIO, 2010).

Em geral, as estruturas moleculares desses compostos sintéticos, oferecem risco a saúde dos consumidores e não satisfazem mais o conceito de alimentos “saudáveis”, esse aspecto vem ganhando cada vez mais destaque já que os consumidores, se tornaram mais exigentes e atentos as questões relacionadas a saúde humana (RAHMAN, 2007).

A partir da consolidação desse cenário, vêm surgindo alternativas aos conservantes sintéticos, só que de origem natural, que podem desempenhar atividade conservante, tanto isolados como associados a conservantes sintéticos, isso tudo, de forma eficiente, atendendo todas as exigências dos órgãos reguladores, e, também, reduzindo os efeitos colaterais relacionados ao emprego de conservantes sintéticos somente (CAROCHO *et al.*, 2014). Alguns compostos são de conhecida atividade conservante e de origem natural, entre eles destaca-se, os terpenos e seus derivados, dentre eles o carvacrol, timol e mentol. O carvacrol é um fenol monoterpenoide, que se faz presente em grande quantidade em orégano, e mesmo em baixa concentração, exerce importante papel na atividade antimicrobiana, principalmente contra *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus sp.* que são os microrganismos de maior incidência em matrizes alimentares (ULTEE; SMID, 2001; ULTEE, BENNIK; MOEZELAAR, 2002; NOSTRO *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2008).

Alguns açúcares complexos de origem natural já são empregados como aditivos alimentares, e apresentam efeito positivo à saúde, sem o relato de toxicidade. A quitosana e seus derivados são utilizadas pela indústria de alimentos e farmacêutica, e essa por sua vez apresenta efeito antimicrobiano, antitumoral, anticancerígeno, anti-inflamatório, antioxidante, entre outros (XIA *et al.*, 2011).

### **3.4 Insumos de origem natural em carnes**

Apesar do ser humano ter algum contato com produtos naturais desde a antiguidade, foi apenas no final do século XIX que se iniciaram os estudos com o objetivo de caracterizar as estruturas vegetais responsáveis por determinadas atividades biológicas específicas (KHAN; ABOURASHED, 2010). Esses estudos demonstram que a aplicação de insumos naturais pode ser mais assertiva e específica, uma vez que os estudos vêm demonstrando comprovada resposta dos compostos. Os estudos apontam ainda que os extratos vegetais, podem ser classificados como alternativas promissoras na substituição de conservantes em alimentos, fundamentalmente por conta do seu elevado teor de compostos com bioatividade (WALLACE, 2004).

As plantas e extratos naturais, como aditivos em alimentos, são responsáveis por retardar o processo oxidativo dos componentes lipídicos (SOARES *et al.*, 2012). Resumidamente, o emprego de conservantes visam preservar as características sensoriais do produto, prolongar a vida útil, reduzir perdas econômicas e manter o alimento apto ao consumo (SOUZA, LIMA E NARAIN, 2003).

Falowo *et al.* (2014) avaliaram a estabilidade oxidativa após aplicação de conservantes naturais com atividade antioxidante em diversos tipos de carnes, observaram então que, o orégano, associado a folhas de sálvia, apresentaram significativa redução da oxidação lipídica, por um período de 98 horas, quando armazenados a 4 °C na concentração de 0,2% de cada um dos dois componentes. O extrato de sementes de uva, aplicado na concentração de 1% à carne cozida, armazenada sob refrigeração (4 °C), obtiveram estabilidade frente à oxidação por um tempo de 9 dias. O alecrim, quando empregado na concentração de 0,1%, em fígado de suínos, também armazenado a 4 °C, apresentou redução das reações oxidativas de proteínas por um tempo de 90 dias, e, por fim, casca de pinho a 1% acrescida à carne suína, que mantida sob refrigeração, obteve redução dos processos oxidativos

dos lipídios por um tempo de 12 dias. De acordo com Maqsood *et al.* (2014) frutas, vegetais, sementes de frutas, cereais, bagas, vinho, chá, azeite, e plantas aromáticas são fontes naturais de compostos antioxidantes, dentre os mais comuns estão a vitamina C, tocoferóis, carotenoides e flavonoides.

Isto posto, fica demonstrado que a busca por substâncias naturais com atividade conservante tem sido cada vez mais explorada pela indústria, com a intenção de substituir conservantes sintéticos com potencial tóxico, que já eram previamente utilizados pela indústria, além de incorporar propriedades funcionais e bioativas, o que tornaria o alimento seguro e saudável para o consumo. Sendo assim, a incorporação de insumos naturais pode incrementar as características sensoriais do produto, tornando-o mais atrativo para o consumidor, que, por sua vez, tem se preocupado cada vez mais com a melhoria na qualidade de vida, em diversos aspectos (HYGREEVA; PANDEY; RADHAKRISHNA, 2014; CAMPÊLO, 2016).

### **3.5 Erva-mate**

A erva-mate, *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. é uma espécie nativa da América do Sul, em clima subtropical, pertencente à família *Aquifoliaceae*, é uma árvore perene, de porte médio para grande, podendo chegar a medir 15 metros de altura, e diâmetro de 40 centímetros de tronco (BRANCO, 2014). É constituída de folhas simples e pequenas, flores brancas e frutos avermelhados. Seu período de floração engloba os meses de setembro a dezembro, e a frutificação entre dezembro e março (SILVA, 2007) (Figura 1).



**Figura 1 - Folhas, flores e árvore da erva-mate**



Fonte: Adaptado de EMBRAPA (2020) e Azevedo (2018)

Como é uma planta resistente às oscilações climáticas, comparando-a aos demais cultivos agrícolas tradicionais, a erva-mate possui considerável valor socioeconômico, e isso se dá por alguns diferentes motivos, um deles é o fato de seu cultivo depender fundamentalmente de labor manual, o que acaba fortalecendo mais as pessoas no campo (VIDOR *et al.*, 2002). Além disso, outro aspecto que interfere no valor gerado pela planta é o de seu consumo estar relacionado às tradições antigas, e amplamente difundida entre os nativos da região de produção.

Seu território de maior incidência se estende por aproximadamente 540.000 km<sup>2</sup>, abrangendo regiões tropicais e subtropicais do Brasil, Argentina e Paraguai (PAGLIOSA, 2009) (Figura 2).

**Figura 2 - Área nativa de *Ilex paraguariensis***



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA e ROTTA (1985)

Os países que compreendem a maior incidência do consumo de erva-mate produzida no Brasil são os do Mercosul, sendo o Uruguai o maior importador da mercadoria nacional, cerca de 85%, seguido pelo Chile (11%), além de outros países como Alemanha, Estados Unidos, Japão, Canadá, Síria, entre outros (CROCETTI, 2012)

De acordo com o IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2015), o Paraná é o maior produtor de erva-mate nacional, sendo responsável por 86% dessa produção, além deste, Santa Catarina (8%), Rio Grande do Sul (6%) e Mato Grosso do Sul (0,1%), completam a lista dos maiores produtores. O estudo do IBGE revelou ainda, que, essa produção, para o estado do Paraná, está distribuída por cerca de 151 municípios, recebendo destaque os que seguem: Cruz Machado, São Mateus do Sul, Bituruna, General Carneiro, Paula Freitas e Inácio Martins. Juntos esses respondem por uma fatia de 63% da produção total do estado.

Por ser um alimento consumido culturalmente desde a antiguidade pelos povos nativos, sua ingestão pode ir muito além das tradicionais infusões e do chimarrão. Os povos nativos iniciaram o consumo desta matriz alimentar por conhecimento empírico, notaram seu efeito estimulante quando ingeriam a folha fresca, o que proporcionava maior resistência e disposição ao trabalho braçal mais pesado (TOMAZZI, 2004). Esse aspecto vem sendo estudado pela comunidade científica, buscando elucidar pontos como a atividade biológica, as estruturas químicas bem como alternativas de aplicações.

Desta forma, as investigações científicas brasileiras têm investido grande enfoque no desenvolvimento de produtos, tanto cosméticos como alimentares, que apresentem características sensoriais particulares, com boa aceitabilidade pelos consumidores, servindo assim como incentivo ao setor ervateiro (PAGLIOSA, 2009).

Todo o esforço das pesquisas atualmente também se fundamenta nas propriedades da erva-mate, propriedades essas que estão relacionadas à inúmeros benefícios a saúde, melhoria no sistema digestivo e hepático (GORZALCZANY *et al.*, 2001), efeitos cardioprotetor e hipocolesterolêmico (SCHINELLA, FANTINELLI e MOSCA, 2005), ação estimulante sobre o sistema nervoso central (MENDES e CARLINI, 2007) e proteção contra processos oxidativos do organismo (BASTOS *et al.*, 2006).

Alguns estudos avaliaram a viabilidade de desenvolvimento de alimentos com a utilização da *Ilex paraguariensis* como insumo. Berté *et al.* (2011) desenvolveram

gelatinas funcionais, com a proposta de ser um alimento com baixo valor calórico, somado aos benefícios da elevada atividade antioxidante. Vieira *et al.* (2008), por sua vez, elaboraram balas a partir do pó da erva-mate, que é caracterizado pelo elevado teor de fibras, tornando assim o alimento como funcional, já que suplementa uma das macromoléculas que cumprem função no organismo humano, além disso, um alimento fonte de fibras reduz o índice glicêmico dos alimentos, as fibras dificultam a absorção dos carboidratos simples.

Costa, Racanicci e Santana (2017), avaliaram em seu estudo, a atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes concentrações de erva-mate em microrganismos extraídos e isolados de amostras de peito de frango. Esse estudo concluiu que a erva-mate apresentou atividade antimicrobiana frente aos dois microrganismos estudados, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*, *in vitro*, sendo que a concentração mínima mais efetiva foi 400 mg/mL para inibir o crescimento dos microrganismos testados.

Camel *et al.* (2012), por sua vez, avaliaram o potencial antioxidante de extrato de erva-mate em frango assado, armazenado e reaquecido. Os pesquisadores fizeram a aplicação do extrato de erva-mate previamente a operação de assamento, que seguiu os seguintes parâmetros, temperatura de 200 °C e um tempo de 90 minutos. Foi identificado que a utilização do extrato reduziu significativamente a oxidação lipídica em relação às amostras não tratadas.

Além disso, Garcia *et al.* (2019) avaliaram a influência da erva-mate como constituinte da ração em aves de corte, avaliando assim a composição química e o perfil lipídico da carne de peito, coxas e sobrecoxas de frango de corte. Para isso foram utilizados quinhentos pintainhos para o teste, e a erva-mate foi incluída na dieta entre o 1º e o 42º dia de idade. Os autores concluíram que, para a carne de peito de frango, não foi percebida diferença significativa, provavelmente à baixa presença de lipídios nesse tipo de corte. Porém, para as amostras de coxa e sobrecoxa, foram observadas alterações no perfil de ácidos graxos saturados, insaturados, monoinsaturados e poli-insaturados. O estudo ainda identificou redução na concentração de ácidos graxos saturados e o aumento da concentração dos ácidos graxos poli-insaturados, o que demonstra a capacidade da erva-mate em alterar o perfil lipídico em carne de aves, quando administrada em sua dieta.

Outro exemplo de aplicação ocorreu em bebidas gaseificadas elaboradas por Mello *et al.* (2009), a base de erva-mate. O estudo teve como objetivo diversificar o mercado, e ofertar alternativas mais saudáveis em comparação a outros produtos

similares ofertados pela indústria, os autores, à partir da análise sensorial, concluíram que as formulações desenvolvidas obtiveram boa aceitação, colaborando com o objetivo de diversificar a forma de consumo de erva-mate.

Martin *et al.* (2013) avaliaram o potencial antimicrobiano do extrato de erva mate contra alguns patógenos alimentares, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* e *Escherichia coli* foram os microrganismos testados, e, concluindo assim que, os efeitos microbiológicos comprovados tornam a erva-mate um potencial conservante natural para aplicação em alimentos.

Esses benefícios a saúde, por sua vez, estão diretamente relacionados a rica composição química, que contempla compostos fenólicos, alcaloides e saponinas (FERNANDES *et al.*, 2017), presentes principalmente nas folhas, e em menor concentração nas demais partes da planta (MAZZAFERA, 1994). Jacques *et al.* (2007) identificaram 51 compostos, dentre eles metilxantinas, fitol, estigmasterol, vitamina E, ácido hexadecanoico. Essa caracterização foi realizada por cromatografia gasosa, acoplada a um espectrofotômetro de massas.

Um último aspecto que precisa ser destacado aqui é o de que, a composição química de vegetais é fortemente dependente de uma ampla gama de fatores, como variações climáticas, altitude, época da colheita, sazonalidade, tempo de cultivo, variações no tipo de cultivo e o processamento empregado (LIN *et al.*, 2003).

### **3.6 Extração de compostos bioativos**

O reino vegetal é responsável por fornecer, há tempos, grande parte das moléculas de interesse científico, compostos esses com potencial de aplicação na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e agroquímica. De acordo com alguns estudos, mais de 80% das substâncias medicamentosas são produtos de origem natural, ou foram inspiradas em compostos naturais (WHO, 2005; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Com base nisso, os estudos que envolvem a química medicinal moderna apontam para uma importância dos produtos naturais para descoberta de novos fármacos ou produtos com propriedades bioativas. Além disso, esses avanços favorecem o mercado e geram mais confiança para a indústria, que passam a ser suportadas por esses novos produtos. Alguns avanços destes podem ser destacados, aspectos como seleção e coleta de plantas, técnicas de isolamento, identificação,

quantificação e elucidação estrutural das moléculas constituintes, métodos para avaliação da atividade biológica e, por fim, procedimento de semi-sínteses e biossínteses (MACIEL *et al.*, 2013).

As análises que são desenvolvidas para a caracterização, em geral, expõem a planta a várias etapas. Geralmente o composto é extraído da fonte, concentrado, fracionado e purificado, produzindo essencialmente uma única substância de interesse. Conquanto a determinação dessas estruturas complexas seja tecnicamente desafiadora, isso não é mais um impasse no processo de caracterização de novas drogas, basicamente devido ao grande avanço tecnológico para tais técnicas. Conforme os primeiros resultados para atividade biológica desses fármacos passem a atender a potência e seletividade esperada, são então procedidos avanços nos estudos preliminares, passando a caracterizar a estrutura e a eficiência do processo de purificação (KOEHN; CARTER, 2005)

Para a eficiência do uso de extratos vegetais em produtos alimentícios como agente antioxidante, alguns aspectos devem ser levados em consideração, além dos pré-processos a que a matéria-prima é submetida, o processo de extração pode interferir no potencial antioxidante do extrato obtido. Eging *et al.* (2009) avaliaram as características químicas e a capacidade antioxidante da erva-mate utilizando o método complexo fosfomolibdênio, com ácido ascórbico e rutina como padrões. O estudo obteve extratos aquosos e hidroalcoólicos de erva-mate *in natura* seca que tiveram sua atividade antioxidante variando entre 28% à 48%, sendo os maiores valores obtidos através do extrato hidroetanólico; e, os extratos das folhas que passaram por cancheamento revelaram uma atividade antioxidante sem variação, de 38%.

A escolha do solvente a ser utilizado na extração é uma etapa crítica do processo, tanto com relação ao tipo de mistura empregada, quanto com relação a proporção de seus componentes (ALOTHMAN; BHAT; KARIM, 2009). Essa variação já foi amplamente testada pela área científica, e foi possível perceber que cada tipo de solvente é facilitador da extração de um tipo de composto fenólico, já que, em teoria, cada composto bioativo dessa classe apresenta uma solubilidade específica (MICHIELS *et al.*, 2012).

É fundamental o emprego de solventes com reduzido ponto de ebulição, como por exemplo, metanol, etanol, acetato de etila, acetona e hexano, isso principalmente para facilitar uma eventual separação posterior. Além disso, o adequado emprego dos

solventes na extração sempre é um ponto crítico do processo, sendo sempre necessário se avaliar algumas alternativas à fim de que seja possível definir uma com maior rendimento da extração dos compostos bioativos (CORREA, 2010; NEVES; SANTOS, 2019).

Partindo do estudo das referências utilizadas, é possível notar que o metanol e o etanol são os solventes mais comumente empregados, já que, o emprego de solventes orgânicos é mais indicado para a extração e isolamento dos compostos bioativos, principalmente por conta da polaridade. Porém é importante se atentar, quanto ao solvente empregado, na segurança do uso desse solvente para a saúde do consumidor, portanto, é importante que se minimize ao máximo esse impacto, e se utilize compostos mais seguros quanto possível for (RODRIGUES, 2011).

Uma alternativa amplamente utilizada é a própria água, sendo também um solvente seguro para emprego em alimentos, assim como o etanol, e é ainda facilitado seu uso pela alta disponibilidade desse elemento em comparação com outros solventes orgânicos, e ainda, afora essas duas questões, o emprego de água como solvente dispensa uma eventual etapa de separação do solvente orgânico futura. Porém, o emprego de água como solvente trás pelo menos duas desvantagens destacáveis, a primeira é uma eficiência significativamente menor para a extração, dado que, em geral, qualquer outro solvente orgânico que possa ser empregado na extração tem polaridade maior que a água, além disso, em uma eventual etapa de secagem futura, quando da necessidade de concentrar o extrato ou obtenção de um extrato seco, a água apresenta uma temperatura de ebulição maior que a dos outros solventes orgânicos, dificultando assim severamente a operação de secagem, além de, como exposto à temperaturas maiores, o extrato sofrerá degradação dos compostos de interesse (FERNANDES, 2019).

Ainda com relação a acidificação do solvente, Bisognini (2019) estudou o emprego de 1% de HCl 6 mol/L em uma mistura de solventes, respeitando uma proporção de 70:30 de água para solvente, sendo testados etanol, acetona e metanol, com o objetivo de avaliar a melhor combinação dos parâmetros que tornasse o extrato com maior teor de compostos fenólicos totais, e maior atividade antioxidante, e os melhores resultados vieram do solvente hidroetanólico acidificado, assistido por ultrassom durante 15 minutos.

Outras variações no processo de extração podem ser empregadas, como por exemplo a utilização de pressão de vapor (XYNOS *et al.*, 2012), ou de ultrassom (JAPÓN-LUJÁN; LUQUE-RODRÍGUEZ; CASTRO, 2006). Esse último geralmente é utilizado em extrações do tipo sólido-líquido, já que o ultrassom promove o efeito de cavitação, permitindo assim uma maior penetração do solvente no interior da célula da planta, e, conseqüentemente, um menor tempo de exposição ao solvente ou ao calor (FILGUEIRAS *et al.*, 2000) além de permitir o emprego de menor quantidade de solvente (VILKHU *et al.*, 2008). Em geral, esses extratos com compostos bioativos são instáveis, ou seja, de fácil degradação, por tanto, a otimização do processo de extração tem também a importância de garantir a estabilidade do produto obtido, já que, não se faz necessário o desenvolvimento dessa etapa utilizando parâmetros extremos, que seriam responsáveis por promover a degradação do extrato (ASPÉ; FERNÁNDEZ, 2011).

### **3.7 Isolamento e caracterização de compostos bioativos**

Algumas etapas são necessárias para a efetiva avaliação da atividade biológica de compostos de origem natural, sejam esses metabólitos primários ou secundários, além da caracterização da atividade biológica de cada composto isoladamente. Dado que as plantas possuem os diversos compostos que as constituem distribuídos por toda a sua estrutura, então, para uma efetiva identificação e quantificação, são necessárias etapas de fracionamento, isolamento e purificação de cada substância que se objetiva caracterizar. Inicialmente, a etapa de fracionamento é responsável por separar compostos a partir de suas características de solubilidade, polaridade e coeficiente de partição em diferentes solventes. Isso é baseado no grau de polaridade crescente dos solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol, que são os mais empregados nesse tipo de procedimento (SIMÕES *et al.*, 2016).

Em seguida, a próxima etapa é o isolamento dos compostos, geralmente realizado por cromatografia. As principais técnicas de cromatografia empregadas atualmente são a cromatografia planar em coluna aberta, cromatografia em papel e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A técnica mais utilizada para essa separação é a CLAE, já que, além de promover a separação dos compostos de uma

matriz complexa, permite também, ao mesmo tempo, sua quantificação. Além disso, essa técnica permite o emprego de diversos detectores, entre eles, ultravioleta e arranjo de diodos, fluorescência, índice de refração, detectores evaporativos com espalhamento de luz (ELSD), entre outros, utilizados para quantificar os compostos de interesse (MEYER, 2013).

Um outro facilitador produto do avanço da área analítica foi o surgimento da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE), que se diferencia da CLAE por empregar como fase estacionária partículas com tamanho inferior a 2 µm, melhorando assim a sensibilidade do método, melhorando ainda a capacidade de resolução em misturas complexas, ou ainda de extratos vegetais, que são ricos em compostos estruturalmente semelhantes, o que pede uma maior resolução do método (SWARTZ, 2005).

Outra alternativa viável para a separação e quantificação de compostos é a Cromatografia Gasosa (CG). Esta técnica, por sua vez, apresenta limitações e demanda de alguns cuidados para que consiga alcançar o que se propõe. Basicamente, é uma técnica aplicada para a separação e análise de misturas, que são constituídas por compostos que precisam, fundamentalmente, apresentar pontos de ebulição de até 300 °C, ser termicamente estáveis, e com alguma volatilidade (LITTLEWOOD, 2013).

### **3.8 Determinação da Atividade Antioxidante**

Os antioxidantes compreendem uma classe de compostos definida como as substâncias que, em baixas concentrações, retardam ou previnem a oxidação do substrato com o qual entrem em contato (HALLIWEL *et al.*, 1995). Alguns aspectos são importantes para que se faça a classificação desse tipo de compostos, pontos como a presença de substituintes doadores de elétrons ou hidrogênio, a capacidade de deslocar o radical formado em sua estrutura, ainda, a capacidade de quelar metais oxidantes durante o processo reativo, por fim, a facilidade de acesso ao local de ação, na molécula, durante a reação (MANACH *et al.*, 2004).

Baseado nisso, a adição de compostos com conhecida atividade antioxidante é fundamental para que se consiga inibir e/ou retardar essas reações oxidativas, dado que, esses compostos trabalham estabilizando os ácidos graxos, com base em



reações com os radicais livres, quelando íons metálicos e interrompendo a fase de propagação da reação de oxidação lipídica (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

A determinação da atividade antioxidante em compostos pode ser executada por diversos métodos simples e confiáveis, alguns desses métodos podem ser, por exemplo, o método de captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), de redução do complexo férrico de 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina ( $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ ) (FRAP), captura do cátion radical ABTS<sup>•+</sup> (ABTS), além ainda da determinação do teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais (SANCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998, SILVA, 2008).

### 3.8.1 DPPH

O método conhecido como DPPH é caracterizado por envolver a captura do radical livre (2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)), e é responsável por determinar, *in vitro*, o potencial antioxidante de diferentes matrizes alimentares. Uma das vantagens ofertadas por esse método é a ampla gama de matrizes que se é permitido analisar, produtos como frutas, vegetais, plantas medicinais, ervas aromáticas, temperos, cereais, leguminosas, chás, folhas, cogumelos, algas, entre outros, isso se dá, fundamentalmente devido a sua alta sensibilidade e aplicabilidade (PRADO, 2009).

### 3.8.2 FRAP

Atualmente, várias metodologias são propostas para determinar o poder de redução de antioxidantes, os mais empregados estão relacionados com a capacidade de reduzir o íon  $\text{Fe}^{3+}$  (ferro III) para  $\text{Fe}^{2+}$  (ferro II). Sendo assim, como estes métodos medem a capacidade de redução, com base na redução do íon ferro, antioxidantes que atuam por transferência de hidrogênio, em especial tióis e carotenoides, não serão determinados. E, por fim, é importante destacar que, os íons  $\text{Fe}^{2+}$  gerados pela redução de  $\text{Fe}^{3+}$  no organismo, podem atuar como pró-oxidantes, devido a formação de novos radicais livres, como o radical hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), por exemplo (BOU-MAROUN *et al.*, 2007).

### 3.8.3 ABTS

A técnica denominada ABTS utiliza como reagente ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), também conhecida como método de capacidade antioxidante de equivalente de Trolox, ou, TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) (SANCHEZ-MORENO, 2002). A análise se baseia na captura do cátion radical ABTS (ABTS<sup>\*+</sup>) e tem sido empregada para determinar a capacidade antioxidante em diversas matrizes, tanto hidrofílicas quanto lipofílicas (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

Outro diferencial que método ABTS apresenta é a geração de um cátion radicalar altamente estável. Em testes realizados por Kuskoski *et al.* (2004) o cátion radicalar ABTS apresentou estabilidade por até 6 horas depois de ser adicionado na amostra, e a solução somente do radical ABTS<sup>\*+</sup> geralmente se mantém estável por um período de 48 horas, depois de transcorrido as 18 horas primeiras. Porém, os parâmetros de tempo necessários para geração, da estabilidade e da solubilidade do ABTS<sup>\*+</sup> podem variar conforme a reação utilizada para gerar o cátion radicalar. Devido a essas variáveis, os analistas costumam preparar a solução de ABTS<sup>\*+</sup> e utilizá-la logo após sua geração, evitando estocar por longos períodos.

Atualmente, no Brasil, as metodologias mais empregadas surgem de alguma adaptação do estudo proposto pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) que elaborou o Comunicado Técnico nº 128 (RUFINO *et al.*, 2007), no qual é descrito o método de captura do cátion radicalar de ABTS para determinação da capacidade antioxidante total em frutas. Esta metodologia se faz uma boa alternativa por ser economicamente acessível.

#### 3.8.4 Compostos Fenólicos

A análise cujo objetivo é quantificar o teor de compostos fenólicos totais presentes em uma matriz leva o nome do principal reagente empregado, Folin-Ciocalteu. O reagente é composto pelos sais tungstato de sódio ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$ ) e molibdato de sódio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$ ) em meio ácido, geralmente se emprega ácido clorídrico concentrado e ácido fosfórico, sendo esse último responsável pela coloração amarela do reagente (BOROSKI *et al.*, 2015).

#### 3.8.5 Flavonoides

As técnicas usadas para a determinação de flavonoides se baseiam na reação de complexação com o metal alumínio. Fatores como a disponibilidade do grupo ligante nos flavonoides, pH, e solventes empregados são importantes para esse ensaio (PAPOTI *et al.*, 2011).

O método originalmente proposto por Dowd (1959) envolve uma reação estequiométrica de 1:1 entre o padrão, nesse caso quercetina, e o sal cloreto de alumínio, em meio ácido, resultando assim na formação de um complexo amarelo, que pode ser monitorado espectrofotometricamente, empregando a água destilada como solvente.

Algumas alterações já propostas ao método original incluem a substituição da água destilada por solventes alcoólicos, geralmente etanol ou metanol, o que torna possível facilitar a solubilização do padrão de quercetina empregado na curva de calibração, além de aumentar a estabilidade do complexo formado. Além dessa, outra modificação que já foi proposta é a acidificação do solvente, metanol, isso seria feito com uma solução 5% v/v de ácido acético (PAPOTI *et al.*, 2011).

### **3.9 Propriedades Antimicrobianas**

Diversas pesquisas sobre fitoquímicos presentes em plantas ditas medicinais foram realizados, principalmente com o objetivo de reduzir os custos, e, ainda, melhorar a qualidade de tratamentos convencionais, já que, estas, constituem uma fonte potencial para a produção de novos medicamentos, ou ainda podem aumentar efeitos dos antimicrobianos convencionais (SILVA; FERNANDES JÚNIOR, 2010).

Boa parte dos alimentos, tanto de origem vegetal como animal, possuem uma vida útil reduzida, já que são ricos em matéria orgânica, sendo deteriorados facilmente, fato esse que traz diretas implicações na qualidade e na segurança do alimento. A deterioração em alimentos pode ocorrer por fatores diversos, dentre eles é importante destacar, o tipo do produto, a composição, formulação, embalagem e estocagem. Seguramente, a principal fonte de deterioração em alimentos é de origem microbiana (MELLO; SOARES; GONÇALES, 2005). Algumas etapas são utilizadas no processamento dos alimentos à fim de se contornar essa questão, em geral essas operações envolvem aplicação de substâncias com atividade conservante, impedindo, ou retardando, essas alterações provocadas pela ação de microrganismos, enzimas ou ainda agentes físicos (HONORATO *et al.*, 2014)

Ainda, de acordo com Savoia (2012), os principais compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana promovida por espécies vegetais, em geral são alcaloides, flavonoides e polifenóis. Sabe-se ainda, que as propriedades bactericidas dos flavonoides provêm da capacidade de formar complexos, tanto com proteínas extracelulares, quanto as proteínas solúveis, além ainda de formar esses mesmos complexos com a membrana celular das bactérias, causando assim uma instabilidade celular (COWAN, 1999; FOWLER *et al.*, 2011).

### 3.9.1 Caracterização da Atividade Antimicrobiana

Diversas são as técnicas com potencial de avaliar a atividade antimicrobiana de uma matriz vegetal, dentre estas, as mais utilizadas são, a difusão em ágar (poços e disco) e de microdiluição, também conhecida como Concentração Inibitória Mínima (MIC). MIC tem sido mais aplicado atualmente, visto que além de ser confiável e econômica, é capaz de avaliar um número maior de microrganismos e ativos, fornecendo ainda dados quantitativos (BONA *et al.*, 2014). A Concentração Inibitória Mínima é realizada em microplaca de 96 poços, permitindo assim o teste de várias concentrações de um mesmo extrato, após sua diluição seriada. Essa análise então consiste na determinação da concentração inibitória mínima do extrato, que é capaz de inibir o crescimento do microrganismo avaliado.

Além da MIC, existe ainda o método conhecido por *checkerboard*, que também é desenvolvido com o auxílio de microplacas. Técnica essa que explora ainda mais o processo de microdiluição, permitindo assim a combinação de compostos e a avaliação da interação entre eles (WHITE *et al.*, 1996; BONAPACE *et al.*, 2000).

Ainda é de grande valor ressaltar que devido à complexidade química que alguns extratos vegetais tenham, torna-se inviável estabelecer relação entre atividade biológica de um único dos ativos isoladamente, já que, as plantas possuem um grande conjunto de compostos que podem atuar em sinergia ou antagonicamente em interações entre si (BRUSOTTI *et al.*, 2014).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

As amostras de erva-mate (*Illex paraguariensis*) utilizadas neste estudo foram colhidas em fevereiro de 2021 em duas localidades do estado do Paraná (Cascavel, com coordenadas 24° 57' 21" S, 53° 27' 18" W, altitude de 711 m, com média de precipitação pluviométrica de 1.841 mm/ano, temperatura média de 20 °C e Santa Maria do Oeste, 24° 56' 20" S 51° 51' 46" O, altitude de 930 m, média de precipitação de 1883 mm/ano, temperatura média anual de 18,0 °C) (Climate-data.org). As amostras foram processadas (tostada, picada para quebra das folhas, secas a temperatura de 90 °C, e socadas) e cedidas pela empresa Terra Mate Indústria de Chimarrão, Chá e Terere, do município de Cascavel, Paraná.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Caracterização das amostras

As amostras foram inicialmente caracterizadas quanto a granulometria, umidade e cor, em triplicata. A análise granulométrica foi efetuada com o auxílio de um agitador de peneiras eletromagnético, marca Bertel (Bertel, Caleiras, Brasil), utilizando seis peneiras com malhas de 12, 30, 60, 100, 140, 200 mesh.

A umidade das amostras foi determinada pelo método gravimétrico em estufa convencional à 105 °C (IAL, 2008). Foi desenvolvida em estufa (Cienlab, Campinas, Brasil), à 105 °C, tomando nota do peso inicial da amostra, com o auxílio de balança analítica (Marte, Modelo AW220, São Paulo, Brasil), e a cada hora após 3 h de secagem até que se alcançasse peso constante entre duas pesagens.

A medida instrumental de cor das amostras foi efetuada com o auxílio de um colorímetro (Konica Minolta, Modelo CR 400, Osaka, Japão), com iluminante D65 e ângulo de visão de 10°. Os parâmetros de L\* (L\* = 100 significa totalmente branco, L\* = 0 significa totalmente preto), a\* [vermelho (+) e verde (-)] e b\* [amarelo (+) e azul (-)] foram medidos.

#### 4.2.2 Obtenção dos extratos

Após a etapa de caracterização das amostras, foram procedidas as extrações de compostos bioativos, com o auxílio de um banho de ultrassom (P120H, Elmasonic P, Singen, Alemanha). Foram utilizados os seguintes parâmetros fixos baseado em Bisognini (2019) com adaptações: temperatura de 70 °C, frequência de 37 kHz, equipamento trabalhando a uma potência de 80% de 580 W, por 60 minutos, variando-se a composição do solvente, conforme Tabela 1. Solução de ácido fosfórico foi aplicada no lugar de solução de ácido clorídrico, considerando a possibilidade de uso deste em alimentos conforme RDC nº 466 de 10 de fevereiro de 2021 (BRASIL, 2021). As extrações foram realizadas com amostras procedentes de Cascavel/PR e Santa Maria do Oeste/PR.

**Tabela 1 - Condições de extração de compostos bioativos aplicadas em amostras de erva-mate**

<b>Tratamento</b>	<b>Solvente</b>	<b>Origem da amostra</b>
HC	Solução Hidroetanólica 70/30	Cascavel – PR
HSM	Solução Hidroetanólica 70/30	Santa Maria do Oeste -PR
FC	Solução Ácido fosfórico 1% v/v em água	Cascavel – PR
FSM	Solução Ácido fosfórico 1% v/v em água	Santa Maria do Oeste -PR
HFC	Solução Hidroetanólica 70/30 + 1% Ácido fosfórico	Cascavel – PR
HFSM	Solução Hidroetanólica 70/30 + 1% Ácido fosfórico	Santa Maria do Oeste -PR

**Nota: H: solução hidroetanólica; F: solução de ácido fosfórico, C: Cascavel; SM: Santa Maria do Oeste.**

**Fonte: Autoria própria (2022)**

As extrações foram realizadas utilizando uma concentração de 2% de amostra nos respectivos solventes (Tabela 1), seguida da etapa de filtração em papel filtro qualitativo de 80 g m<sup>-2</sup> (Marca Unifil), com auxílio de uma bomba de vácuo (TE-0581, Tecnal, Piracicaba, Brasil), armazenados em frasco âmbar até as análises de compostos bioativos e atividade antioxidante.

#### 4.2.3 Determinação dos teores de compostos bioativos e atividade antioxidante dos extratos

Os extratos foram caracterizados quanto ao teor de cafeína e ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ), e estimativa do teor de fenólicos totais e flavonóides totais e tiveram sua atividade antioxidante determinada pelas metodologias: captura do radical livre de DPPH, determinação da atividade doadora de íons hidrogênio ao radical ABTS<sup>+</sup>, poder de redução de ferro pelo método FRAP (*Ferric Reducting Ability Power*).

##### 4.2.3.1 Determinação de 5-ACQ e cafeína

A determinação dos teores de cafeína e ácido 5-cafeoilquínico foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (UHPLC) na Central Analítica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em Toledo-PR, conforme metodologia de Tonet, Zara e Tiunan (2019) com adaptações. O equipamento utilizado foi da marca Thermo Fisher Scientific, modelo UltiMate 3000, equipado com detector UV-VIS modelo VWD-3400RS, forno modelo TCC-3400RS, sistema de injeção manual (20 µl), bomba quaternária LPG-3400SD, com detecção realizada a 325 e 272 nm.

O software utilizado na análise dos dados foi o Empower<sup>®</sup> 3. A coluna empregada na separação cromatográfica foi do tipo C18 (octadecilsilano), ZORBAX Eclipse XDB (250 mm × 4,6 mm, 5 µm), à 25 ± 1 °C. A coluna foi mantida a 45 ± 1 °C. A fase móvel empregada na análise foi constituída de água ultrapura acidificada com ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v) (A) e metanol (B), com fluxo de 0,7 mL/min e gradiente de concentração conforme demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2 - Gradiente da proporção da fase móvel com relação ao tempo de análise na determinação de 5-ACQ e cafeína em UHPLC**

Tempo (min)	% A	% B
0	80	20
1	60	40
6	43	57
8	10	90
10	10	90
12	80	20
18	80	20

Fonte: Autoria própria (2022)

Curvas de calibração foram construídas com concentrações conhecidas de 5-ACQ na faixa de 0,01 a 0,05 mg mL<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,9992$ ) e cafeína na faixa de 0,02 a 0,06 mg mL<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,9981$ ). Os resultados foram expressos em mg 100 g<sup>-1</sup> de erva-mate em base seca. Amostras dos extratos líquidos foram filtradas em filtro de Nylon (0,45 µm) e injetadas no cromatógrafo com diluição de 1:20 em água ultrapura com solução de TFA 0,1% (v/v) e metanol (50:50).

#### 4.2.3.2 Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada segundo Boroski *et al.* (2015), 250 µL do extrato diluído cinquenta vezes, juntamente com 250 µL da solução do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, 2N) e 500 µL de solução saturada de carbonato de sódio 20%, juntamente com 4,0 mL de água ultrapura, foram adicionados em tubo de ensaio, em seguida, agitado e homogeneizado. Respeitou-se um tempo de reação de 30 minutos ao abrigo de luz, para que então fosse lida a absorbância em comprimento de onda máximo de 725 nm, em espectrofotômetro UV-Vis (PerkinElmer, Lambda XLS, Beaconsfield, Reino Unido).

Uma curva padrão com concentrações de 20, 40, 60, 80, 100 e 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido gálico (Êxodo científica, Pureza 99%) foi obtida, sendo cada uma das concentrações submetidas a reação seguindo o mesmo procedimento descrito para o extrato de erva-mate. Adicionalmente, também se fez um controle, com substituição do extrato por etanol. Os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG) 100 g<sup>-1</sup> de amostra.

#### 4.2.3.3 Determinação de flavonoides totais

A determinação do teor de flavonoides totais foi efetuada conforme Boroski *et al.* (2015). O padrão empregado nessa análise foi quercetina, preparado em concentração de 2000 mg L<sup>-1</sup> e após diluído nas concentrações de 0, 20, 40, 60, 80, 100, e 200 mg L<sup>-1</sup>, para construção da curva de calibração. 500 µL do extrato, previamente diluído (50 vezes), foram adicionados de 250 µL da solução de cloreto de alumínio 5% (v/v em metanol) e 4,25 µL de metanol em tubos de ensaio. Homogeneizou-se os tubos, e, manteve-se ao abrigo de luz, por 30 minutos. Um branco foi preparado nas mesmas condições, apenas substituindo a amostra por



metanol. A absorvância das amostras e da curva foram lidas em comprimento de onda de 425 nm, em espectrofotômetro UV-Vis (PerkinElmer, Lambda XLS, Beaconsfield, Reino Unido). Os resultados obtidos foram expressos em g equivalente de quercetina (EQ) 100 g<sup>-1</sup> de extrato de erva-mate.

#### 4.2.3.4 Captura do radical livre DPPH

O método DPPH foi realizado conforme metodologia descrita por Boroski *et al.* (2015). Foram adicionadas 100 µL do extrato, diluído 50 vezes, em seguida, 2,0 mL da solução etanólica de 0,1192 mMol L<sup>-1</sup> do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), respeitado o tempo de reação, de trinta minutos, para que na sequência, se realizasse a leitura em comprimento de onda máximo de 517 nm, utilizando etanol como branco, e um controle positivo com 100 µL de etanol no lugar do extrato.

Uma curva de calibração com o padrão Trolox foi construída com as concentrações, 0, 100, 500, 1000 e 1500 e 2000 µMol L<sup>-1</sup>. A mesma solução de DPPH foi empregada na construção da curva, foram então adicionados 25 µL de cada uma das diluições de Trolox, além de 2 mL da solução de DPPH, após homogeneizado, novamente aguardou-se um tempo de reação de 30 minutos, e após efetuado a leitura da absorvância em comprimento de onda de 517 nm. Os resultados foram expressos em equivalência em g de Trolox 100 g<sup>-1</sup> amostras que reagiram com o radical DPPH.

#### 4.2.3.5 Captura do radical ABTS

De acordo com o método proposto por Boroski *et al.* (2015), prepararam-se as soluções de ABTS com concentração 7,0 mMol L<sup>-1</sup>, de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, com concentração de 20 mMol L<sup>-1</sup>, KOH com concentração de 20 mMol L<sup>-1</sup> e persulfato de potássio com concentração de 140 mMol L<sup>-1</sup>. O preparo da solução de ABTS diluída foi feita ajustando-se a absorvância, em comprimento de onda de 730 nm, em valores compreendidos entre 0,698 e 0,702.

A solução do radical foi disposta em volume de 4 mL em tubos de ensaio, em seguida adicionado 10 µL da amostra já na diluição adequada, homogeneizado e, na sequência, mantido em repouso por 6 minutos, procedendo assim à leitura em comprimento a 730 nm em espectrofotômetro (Lambda XLS, PerkinElmer,

Beaconsfield, Reino Unido), o branco foi lido com água ultrapura, e um controle foi feito com a substituição da amostra por água ultrapura.

Para a construção da curva de padrão de Trolox, foram preparadas soluções com concentrações de 1, 2, 3, 5, e 8 mMol L<sup>-1</sup>. As leituras dos pontos da curva foram realizadas em triplicata, sendo adicionados 4 mL da solução de ABTS diluída e ajustada, e 100 µL da solução de trolox diluída, respeitado um tempo de reação de 6 minutos antes da leitura da absorbância. Os resultados foram expressos em equivalência em g de Trolox 100 g<sup>-1</sup> de amostra.

#### 4.2.3.6 Poder de redução pelo método FRAP (*Ferric Reducing Ability Power*)

A análise de FRAP foi efetuada seguindo-se a metodologia de Boroski *et al.* (2015), iniciando-se pelo preparo da solução do reagente FRAP ([Fe<sup>3+</sup>(TPTZ)<sub>2</sub>]Cl<sub>3</sub>) a partir de uma solução tampão acetato de sódio, de concentração 300 mMol L<sup>-1</sup>, com pH ajustado em 3,6. 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) foi utilizado com concentração de 10 mMol L<sup>-1</sup>. Além ainda, de uma solução de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O a 20 mMol L<sup>-1</sup>. A proporção de tampão:TPTZ:Fe<sup>3+</sup> foi de 10:1:1 (v/v/v), para 10,0 mL de tampão, utilizou-se 1,0 mL de TPTZ e 1,0 mL de solução de Fe<sup>3+</sup>. Após foram acrescentados 100 µL da amostra já diluída, e 300 µL de água ultrapura foram homogeneizados e mantido sob aquecimento em banho maria a 37 °C por 30 minutos, em seguida, realizou-se as leituras de absorbância, com comprimento de onda de 593 nm.

Para a curva de calibração, utilizou-se uma solução aquosa com concentração conhecida de íons Fe<sup>2+</sup>, sendo empregada soluções de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O com concentração variada de 0 a 2000 µMol L<sup>-1</sup>. Esse padrão foi adicionado na solução do reagente FRAP da mesma forma empregada com as amostras, sendo respeitadas as mesmas condições de reação, e seguido a leitura de absorbância no mesmo comprimento de onda. O resultado foi expresso em g Fe (II) 100 g<sup>-1</sup> de amostra.

#### 4.2.4 Secagem dos extratos e avaliação do teor de 5-ACQ e cafeína do extrato seco

Definidos quais extratos apresentavam maior atividade antioxidante, novas extrações dos extratos HC e HSM foram efetuadas e os extratos líquidos obtidos foram então secos em *spray dryer* (LabMaq do Brasil, modelo MSD 1.0, Ribeirão Preto, Brasil). Os parâmetros de secagem foram baseados em testes prévios. A alimentação

para a câmara de secagem foi realizada por meio de bomba peristáltica sob condições constantes de pressão do compressor do ar de secagem de 2 kgf cm<sup>-2</sup>, fluxo de ar comprimido de 25 L min<sup>-1</sup> e diâmetro de saída do ar no sistema de 1 mm. O fluxo de ar de secagem foi de 55 Nm<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>, com vazão de alimentação de 0,3 L h<sup>-1</sup> e temperatura do ar de secagem de 90 °C. O extrato seco produzido foi coletado na base do ciclone e armazenado em frascos de vidro, tampados, e armazenados em congelador, com temperatura de - 4 °C ± 2 °C.

Após secos os extratos foram também avaliados quanto aos teores dos compostos bioativos (5-ACQ e cafeína). Para amostras constituídas de extrato seco foram transferidas alíquotas de 10 mg em balão de 10 mL, completando-se o volume com água ultrapura acidificada com TFA 0,1% (v/v) e metanol (50:50), dissolveu-se em ultrassom por 15 minutos, em seguida filtrou-se em filtro de Nylon (0,45 µm) e injetou-se no cromatógrafo com diluição 1:2. O procedimento e parâmetros cromatográfico foram descritos no item 4.2.3.1.

#### 4.2.5 Atividade antimicrobiana do extrato seco de erva-mate

Essa análise foi desenvolvida com base na metodologia proposta por CLSI (2015), sendo realizada a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima, sendo os microrganismos testados os seguintes, *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10.031), *Escherichia coli* (ATCC 43.888) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29.213).

A análise foi realizada a partir de microdiluições, em microplacas de 96 poços, após diluição em série do extrato e adição do inóculo (definido pela escala de McFarland à 0,5) a cada poço. Prosseguindo para incubação a 36 °C por um tempo de 24 horas, em estufa bacteriológica. Em seguida, após ser respeitado o tempo de incubação, foi aplicado à cada poço da microplaca 5 µL de solução de cloreto de trifeniltetrazólico (TTC) com concentração de 0,5%, sendo necessário nova incubação, nos mesmos 36 °C, mas por um período de 3 horas, para possibilitar a visualização dos resultados, permitindo assim que o TTC reagisse.

Como resultado, o que era observado era a mudança na coloração dos poços, quando apresentavam coloração rosa, indicava o crescimento do microrganismo, e permaneciam azul caso o crescimento do microrganismo fosse inibido, ou seja, se não fosse percebido o crescimento do microrganismo. Com base nisso, foi possível definir

a CIM como sendo a menor concentração do extrato, em mg mL<sup>-1</sup>, capaz de impedir o crescimento microbiano.

E para a concentração bactericida mínima (CBM) foram transferidas alíquotas de cada poço onde não se observou crescimento visual, para ágar Muller Hinton, sendo as placas incubadas a 36 °C por 24 h. A concentração bactericida mínima ficou definida como a menor concentração de extrato capaz de inativar o inóculo.

#### 4.2.6 Aplicação dos extratos de erva-mate em linguiça frescal

##### 4.2.6.1 Elaboração das formulações

Foram desenvolvidas três formulações de linguiça frescal do tipo toscana, duas com aplicação dos extratos de erva mate (0,5 e 2%, respectivamente, de extrato hidroetanólico 30%, seco por atomização, de erva-mate originária de Cascavel/PR) e uma padrão (com antioxidante sintético comercial a base de eritorbato de sódio (Conditec, Medianeira, Paraná), utilizando como base a formulação apresentada na Tabela 3, definida conforme legislação vigente (BRASIL, 2000).

**Tabela 3 - Formulação base para elaboração de linguiça toscana**

<b>Ingredientes</b>	<b>%</b>
Carne suína (paleta/retalhos)	76,00
Toucinho	15,00
Água gelada	3,00
Gelo	3,00
Sal	1,70
Cura rápida	0,25
Antioxidante	*
Condimento para linguiça toscana	0,50
Alho em pó	0,10
Pimenta branca	0,02
Glutamato monossódico	0,10
Orégano	0,00
Tempero verde	0,02
TOTAL	100,00

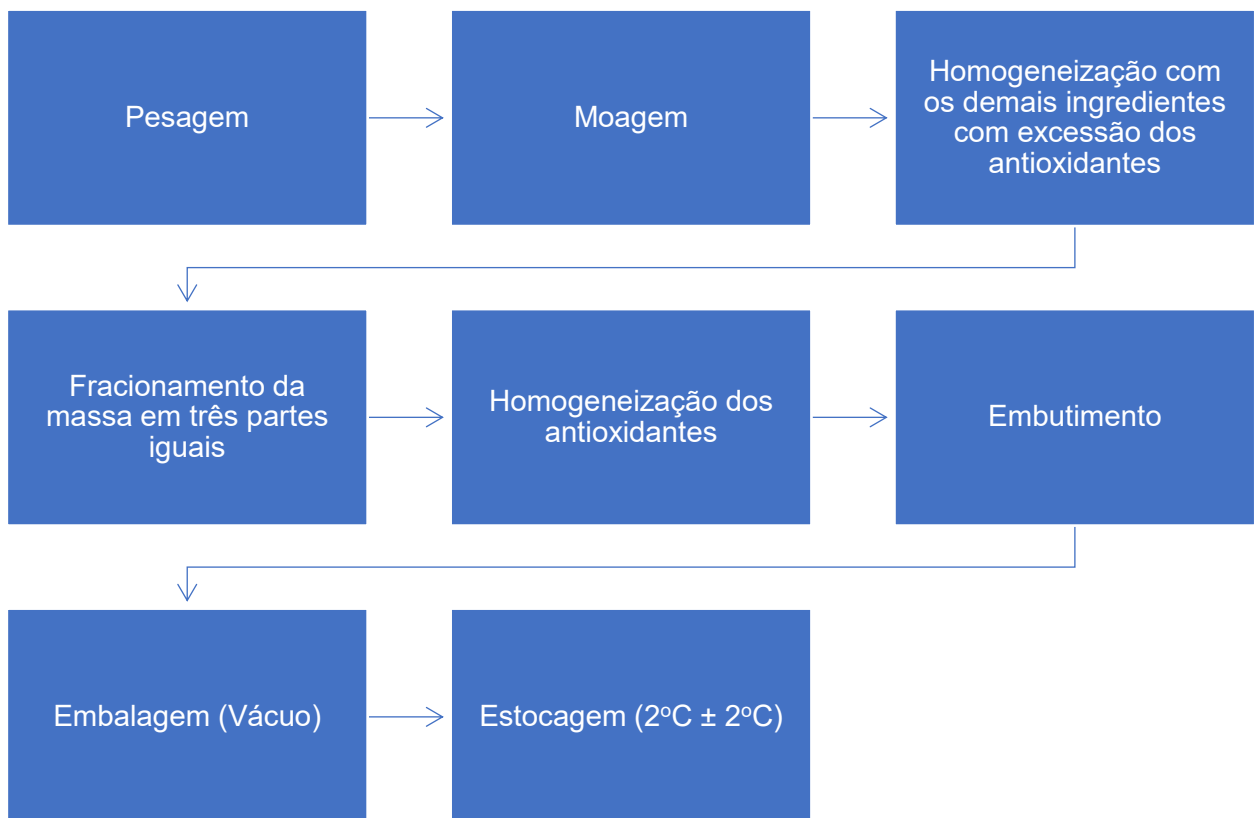
**Nota: \* Formulação padrão: 0,25\* de eritorbato de sódio, Formulações com extrato de erva-mate, 0,5 e 2% de extrato seco.**

**Fonte: Autoria própria (2022)**

As concentrações do extrato foram definidas conforme resultados obtidos por Fetsch (2022) para determinação da atividade antioxidante do antioxidante sintético (Eritorbato), e a partir disso, foi calculado a concentração equivalente com base nos resultados da atividade antioxidante do extrato de erva-mate obtidos anteriormente.

A matéria-prima cárnea foi adquirida em um mercado no município de Medianeira – PR. O processamento das amostras de linguiça foi efetuado conforme fluxograma apresentado na Figura 3. Conforme apresentado no fluxograma da Figura 3, primeiramente as matérias-primas foram pesadas conforme formulação previamente definida, as carnes foram moídas em *cutter* (MADO, Garant MTK 661, Alemanha). Posteriormente, foram adicionados os demais ingredientes à carne, com exceção dos antioxidantes, e a massa foi homogeneizada. Como foram feitas três formulações distintas, a massa foi então fracionada em partes iguais, e, na sequência, os antioxidantes foram adicionados em cada formulação, conforme previamente definidas as quantidades.

**Figura 3 – Fluxograma do processo produtivo das formulações de linguiça toscana**



**Fonte: Autoria própria (2022)**

Após a adição dos antioxidantes de cada formulação, a massa foi novamente homogeneizada (Figura 4) e seguiu para embutimento em gomos de 10 cm em tripa suína utilizando embutideira (IV20, série V195001, RB engineering, Itália), e embalagem a vácuo com seladora (Microvac CV8, Selovac, São Paulo, Brasil). As amostras foram armazenadas sob refrigeração, por 30 dias, com temperatura controlada de  $2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para que posteriormente seguisse para as devidas análises durante vida útil.

**Figura 4 - Massa homogeneizada após adição dos antioxidantes, em ordem, formulação padrão, adição de 0,5% de extrato de erva mate e 2% de extrato**



**Fonte: Autoria própria (2022).**

#### 4.2.6.2 Análises físico-químicas das formulações

Após a elaboração (tempo=0) as formulações foram analisadas quanto a umidade, cinzas, teor de proteínas e teor de lipídios, em triplicata. A análise de umidade foi realizada conforme metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008), pesando-se aproximadamente 3 g de cada amostra de linguiça toscana, e dispostas em cadinhos de porcelana previamente secos e pesados, passando então para a etapa de secagem, a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em estufa, até peso constante. Para determinação de cinzas foram pesados 5 g de cada amostra, seca em estufa, e em seguida os cadinhos eram encaminhados para o forno mufla, a  $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até que o material incinerado tivesse coloração branca (IAL, 2008). A determinação de proteína bruta foi realizada através da análise de determinação dos teores de nitrogênio totais pelo método de Kjeldahl, conforme metodologia proposta pela AOAC (2000). A amostra (aproximadamente 0,5 g) foi digerida com uma mistura digestora (sulfato de cobre, selenito de sódio, e sulfato de sódio) e ácido sulfúrico, em bloco digestor. Em seguida, as amostras seguiram para destilação e foram quantificadas por titulação com solução de HCl 0,1M. Por fim, o

teor de lipídios foi determinado com base na metodologia proposta por Soxhlet (SOXHLET, 1879), onde 2 g de amostra passam por uma etapa de extração à quente, com o emprego de solventes, nesse caso éter de petróleo. Em seguida, após a extração, as amostras seguiram para uma secagem em estufa, para que se separasse o solvente dos lipídios, sendo o resíduo seco a resposta para a determinação de teor de lipídios totais.

#### 4.2.6.3 Perda de peso no cozimento

As amostras avaliadas quanto a perda de peso do cozimento conforme Francisco *et al.* (2013), sendo determinada pela diferença de peso das amostras antes (P1) e após o cozimento em forno elétrico pré-aquecido a 250 °C (P2), após atingir a temperatura interna de 72 °C.

#### 4.2.6.4 Colorimetria

A análise de cor das amostras cruas em diferentes intervalos de tempo, 0, 15 e 30 dias de vida útil, e ainda após assamento no tempo 0, foi realizada com o auxílio de um colorímetro Minolta CR 400 e iluminante D65 e ângulo de visão de 10°.

As respostas apresentadas pelo equipamento são valores de L,  $a^*$  e  $b^*$ , sendo L chamado de luminosidade, ou componente branco-preto,  $a^*$  é o componente vermelho-verde e  $b^*$ , componente amarelo-azul.  $a^*$  e  $b^*$  estão centrados em um sistema de eixos cartesianos  $x^*y^*$ , e seu princípio é baseado no fato que uma cor não pode ser vermelha e verde ao mesmo tempo, ou ainda azul e amarelo. O eixo das abscissas  $a^*$  apresenta variação de valores de -60 a 60, mesma variação presente no eixo das ordenadas  $b^*$ . Já o valor de L, que pode ser representado no eixo z, varia de 0 (preto) a 100 (branco).

Uma outra forma de expressar o resultado, nesse mesmo eixo cartesiano é através das coordenadas L, h e C. L indica a luminosidade, como anteriormente, h indica o ângulo da tonalidade, iniciando no eixo  $+a^*$ , e se desloca no sentido anti-horário, e C indica a distância do centro do eixo.

#### 4.2.6.5 Oxidação lipídica

A determinação da oxidação lipídica foi realizada conforme método de quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) proposta por Tarladgis *et al.* (1964) e modificada por Crackel *et al.* (1988). Esse método se baseia na complexação do malonaldeído a partir de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), promovendo assim uma alteração na coloração, que é medida através de espectrofotometria. 10 g de amostra foram homogeneizados com 98 mL de água destilada, 2,5 mL de ácido clorídrico 4 N, e 5 gotas de solução antiespumante (8 partes de Span 80 e 1,3 partes de Tween 20). Essa mistura foi destilada por 10 minutos, coletando ao final 50 mL de destilado. Em seguida, alíquotas de 5 mL do destilado reagiram com uma solução de TBA, 5 mL e concentração de 0,02 M, após reação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 530 nm, e a resposta expressa em mg de malonaldeído  $\text{kg}^{-1}$  de amostra.

#### 4.2.6.6 Determinação do perfil de ácidos graxos das amostras

Para a extração e esterificação dos ácidos graxos seguiu-se a metodologia de Figueiredo *et al.* (2016) com algumas adaptações. As amostras de linguiça foram trituradas e pesadas (100 mg) em tubos Falcon de 15 mL e adicionadas de 2 mL de solução de NaOH em metanol  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ . Em seguida, as amostras foram homogeneizadas com o auxílio de um vórtex por 2 min. Os tubos foram levados para um banho de ultrassom (P120H, Elmasonic P, Singen, Alemanha), operado a uma potência de 165 W, 25 kHz de frequência, por 5 min a 25 °C. Após, 2 mL de uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  em metanol  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$  foram adicionados aos tubos, sendo submetidos a mais uma etapa de sonicação por 5 min. 1 mL de n-heptano foi adicionado aos tubos, sendo submetidos a agitação em vórtex por 30 s. Então, os tubos foram centrifugados à 2000 rpm por 1 min, sendo em seguida adicionados de 500  $\mu\text{L}$  de solução de padrão interno (23:0) na concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . A fase superior contendo os éteres metílicos de ácido graxos (FAME) foi coletada e injetada no cromatógrafo gasoso. Os FAMEs foram quantificados utilizando-se um cromatógrafo gasoso com detector de ionização em chama (Perkin Elmer, Clarus 680 GC, Waltham, MA, EUA) e coluna capilar de sílica fundida (100 m x 0,25 mm) com



0,25  $\mu\text{m}$  de cianopropilpolisiloxano CP 7420. A rampa de temperatura da coluna foi programada em: 80  $^{\circ}\text{C}$  por 1 min; 20  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 160  $^{\circ}\text{C}$ ; 1  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 198  $^{\circ}\text{C}$ , 5  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 250  $^{\circ}\text{C}$  e mantido por 1,6 min. O detector e o injetor foram mantidos a 250  $^{\circ}\text{C}$  e 240  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, usando-se um split de 1/100. O fluxo dos gases foi de 1,1  $\text{mL min}^{-1}$  para o gás de arraste (He) e de 40 e 400  $\text{mL min}^{-1}$  para os gases da chama,  $\text{H}_2$  e ar sintético, respectivamente. A identificação dos ácidos graxos foi baseada em padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME, Sigma-Aldrich). A área dos picos foi determinada por integrador acoplado ao cromatógrafo gasoso. As análises foram conduzidas em triplicata e os resultados foram expressos como mg de ácido graxo por 100 g de amostra ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ).

#### 4.2.7 Análise dos dados

Os resultados das análises foram expressos pela média  $\pm$  desvio padrão (DP). As análises estatísticas realizadas por esse estudo foram construídas a partir da Análise de variância (ANOVA), e também o teste de comparação de médias, teste de Tukey, com um grau de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). As análises foram realizadas com o suporte do *software* Statistica 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) e do Microsoft® Office 365 Excel.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Compostos bioativos, atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos de erva-mate

As amostras de erva-mate foram caracterizadas quanto ao teor de umidade, granulometria e medida instrumental de cor. Para umidade, a amostra do município de Cascavel/PR apresentou valor médio de  $5,39 \pm 0,22\%$ , e a de Santa Maria do Oeste obteve valor médio de  $5,45 \pm 0,10\%$ . Na análise de cor obteve-se os seguintes resultados para a amostra de Cascavel/PR,  $L = 41,81 \pm 0,28$ ,  $a^* = -14,43 \pm 0,09$  e  $b^* = 30,73 \pm 0,15$ . E amostra de Santa Maria do Oeste/PR os valores foram de  $L = 46,30 \pm 0,41$ ,  $a^* = -14,51 \pm 0,10$  e  $b^* = 33,42 \pm 0,12$ .

Para a análise granulométrica, cujos resultados seguem descritos na Tabela 4, obteve-se maior percentual de retenção nos tamises de Mesh 30 e 60, e em seguida, o de Mesh 100, que, somados, retiveram aproximadamente metade da amostra, portanto, foram essas as granulometrias utilizadas para a elaboração do extrato.

**Tabela 4 - Análise granulométrica (média e desvio padrão) para as amostras de erva-mate obtidas a partir de Cascavel e Santa Maria do Oeste, no Paraná**

Tamis	Cascavel (%) $\pm$ DP	Santa Maria do Oeste (%) $\pm$ DP
12	$14,03 \pm 1,51$	$14,49 \pm 0,96$
30	$21,85 \pm 2,30$	$25,16 \pm 4,22$
60	$30,91 \pm 2,31$	$34,42 \pm 8,90$
100	$23,15 \pm 2,54$	$19,36 \pm 4,76$
140	$6,96 \pm 2,10$	$4,63 \pm 4,41$
200	$2,76 \pm 1,56$	$1,62 \pm 2,80$
Fundo	$0,32 \pm 0,58$	$0,32 \pm 0,56$

Fonte: A autoria própria (2022)

Na Tabela 5 podem ser observados os resultados para os teores de compostos bioativos e atividade antioxidante dos extratos.

**Tabela 5 - Teores de compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos de erva-mate colhida em Cascavel e Santa Maria do Oeste no Paraná, extraídos com diferentes solventes**

Amostra*	5-ACQ (g 100 g <sup>-1</sup> )	Cafeína (g 100 g <sup>-1</sup> )	Flavonoides totais (mg EQ 100 g <sup>-1</sup> )	Compostos fenólicos totais (g EAG 100 g <sup>-1</sup> )	ABTS (g ET 100 g <sup>-1</sup> )	DPPH (g ET 100 g <sup>-1</sup> )	FRAP (g E Fe(II) 100 g <sup>-1</sup> )
FC	7,044 ± 0,246 <sup>b</sup>	3,429 ± 0,081 <sup>a</sup>	503,176 ± 18,789 <sup>b</sup>	12,641 ± 1,312 <sup>b</sup>	64,175 ± 8,204 <sup>ab</sup>	25,617 ± 0,536 <sup>b</sup>	79,329 ± 0,802 <sup>b</sup>
FSM	4,359 ± 0,152 <sup>d</sup>	2,083 ± 0,046 <sup>c</sup>	488,317 ± 10,757 <sup>b</sup>	09,751 ± 0,425 <sup>d</sup>	58,601 ± 2,731 <sup>b</sup>	26,065 ± 1,210 <sup>b</sup>	75,824 ± 5,166 <sup>b</sup>
HFC	4,397 ± 0,076 <sup>d</sup>	2,472 ± 0,033 <sup>b</sup>	303,332 ± 35,392 <sup>c</sup>	14,465 ± 1,278 <sup>a</sup>	64,431 ± 7,793 <sup>ab</sup>	30,220 ± 0,876 <sup>a</sup>	75,467 ± 2,499 <sup>b</sup>
HFSM	3,763 ± 0,247 <sup>e</sup>	1,938 ± 0,109 <sup>c</sup>	178,474 ± 5,325 <sup>d</sup>	11,876 ± 1,164 <sup>bc</sup>	63,854 ± 6,582 <sup>ab</sup>	25,184 ± 0,967 <sup>b</sup>	67,494 ± 2,505 <sup>c</sup>
HC	7,607 ± 0,220 <sup>a</sup>	3,304 ± 0,138 <sup>a</sup>	526,764 ± 48,561 <sup>b</sup>	12,892 ± 0,396 <sup>ab</sup>	66,547 ± 6,307 <sup>ab</sup>	24,942 ± 0,899 <sup>b</sup>	85,533 ± 3,249 <sup>a</sup>
HSM	5,907 ± 0,167 <sup>c</sup>	2,602 ± 0,037 <sup>b</sup>	739,089 ± 29,787 <sup>a</sup>	10,617 ± 0,794 <sup>cd</sup>	75,974 ± 12,494 <sup>a</sup>	25,199 ± 1,218 <sup>b</sup>	76,283 ± 1,229 <sup>b</sup>
Curva de Calibração	y = 1970x + 1,8002	y = 626,7x + 0,7338	y = 0,007x + 0,00 0,9990	y = 0,0011x + 0,0026	y = -280,49x + 0,6087	y = 0,0093x + 0,03 0,9963	y = 0,4666x + 0,6155
R <sup>2</sup>	0,9992	0,9981	0,9990	0,9677	0,9767	0,9963	0,9977

**FC: Extrato de erva-mate (Cascavel/PR) em solução de ácido fosfórico 1% (v/v); FSM: Extrato de erva-mate (Santa Maria do Oeste/PR) em solução de ácido fosfórico 1% (v/v); HFC: Extrato de erva-mate (Cascavel-PR) em solução hidroetanólica (70:30) acidificada com ácido fosfórico 1% (v/v); HFSM: Extrato de erva-mate (Santa Maria do Oeste/PR) em solução hidroetanólica (70:30) acidificada com ácido fosfórico 1% (v/v); HC: Extrato hidroetanólico (70:30) de erva-mate (Cascavel/PR); HSM: Extrato hidroetanólico (70:30) de erva-mate (Santa Maria do Oeste/PR). b.s.: base seca; Resultados expressos pela média ± desvio padrão (n=3); Médias com diferentes letras minúsculas sobrescritas entre as linhas indicam diferença significativa entre as extrações pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).**

Fonte: Autoria própria (2022).

Na análise de compostos bioativos, os extratos apresentaram valores de 5-ACQ variando de 3,76 a 7,61g 100 g<sup>-1</sup> de erva-mate e de cafeína entre 1,93 e 3,43 g 100 g<sup>-1</sup> de erva-mate (Tabela 4).

A cafeína é um dos compostos classificados como metilxantinas, esse grupo está entre os compostos bioativos principais da erva-mate, e é a responsável pelas propriedades estimulantes já conhecidas da mesma (ANESINI *et al.*, 2012; FILIP *et al.*, 1998).

Existe ainda uma relação entre o poder antioxidante e o teor de cafeína de uma matriz, apesar de se saber que as metilxantinas podem apresentar tanto atividade antioxidante como pró-oxidativa, Fujioka e Shibamoto (2006), em seu estudo, propuseram a comparação de extratos de café descafeinados e não-descafeinados, e os extratos não-descafeinados apresentaram maior atividade antioxidante.

A ingestão de cafeína na dieta humana apresenta uma ação estimulante no sistema nervoso central, e, também, é responsável pela elevação do catabolismo de lipídios nos músculos em atividade, melhora ainda a ordenação das funções cerebrais (RESENDE *et al.*, 2012). Porém, o consumo em excesso dessa substância pode ter efeitos colaterais de mesma ordem, como palpitação, distúrbios gastrointestinais, ansiedade, alteração de humor, problemas de sono e aumento na pressão arterial (BASTOS *et al.*, 2007; FREDHOLM *et al.*, 1999).

O ácido clorogênico (5-ACQ) é o principal representante dentre os ácidos polifenólicos, esses, são produto da reação de esterificação do ácido cafeico com o ácido quínico,. O ácido clorogênico tem sua utilização principalmente como aditivo em bebidas, cosméticos e alimentos, além da indústria farmacêutica. Suas propriedades benéficas no organismo humano são principalmente a sua capacidade antioxidante, seu poder hipoglicemiante, atividade antiviral e hepatoprotetora (BRAVO *et al.*, 2007; da SILVEIRA *et al.*, 2017; GULLÓN *et al.*, 2018; DELAGE *et al.*, 1991; BUTIUK *et al.*, 2016; FARAH e DONANGELO, 2006).

Tonet (2017) avaliou o emprego de extrato hidroetanólico de erva-mate como agente conservante em hambúrguer de peixe, sendo o extrato constituído de 4,96 g 100 g<sup>-1</sup> de ácido clorogênico e 3,45 g 100 g<sup>-1</sup> de cafeína. Ainda, Bojić *et al.* (2013), avaliaram um extrato aquoso de erva-mate, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência como método de detecção de cafeína e ácido clorogênico, obtendo, nesse caso, respectivamente, 0,30 g 100 g<sup>-1</sup> e 0,54 g 100 g<sup>-1</sup>, resultados sensivelmente

inferiores principalmente por conta possivelmente do emprego de água como solvente. Por fim, Balzan *et al.* (2013) avaliaram extratos aquosos, etanólicos (70%) e com n-butanol de *Ilex paraguariensis*, e, para o extrato hidroetanólico, encontraram valores para cafeína e ácido clorogênico, de 1,93 g 100g<sup>-1</sup> para cafeína, e 3,36 g 100 g<sup>-1</sup> de ácido clorogênico.

A acidificação das soluções com ácido fosfórico para obtenção dos extratos de erva-mate resultou em menores teores de 5-ACQ ( $p \leq 0,05$ ) para as ervas-mate proveniente dos dois municípios estudados. O maior teor foi observado para amostra oriunda de Cascavel/PR, extraída em solução hidroetanólica ( $7,61 \pm 0,22$  g 100 g<sup>-1</sup>). Contudo, a acidificação não impactou significativamente ( $p > 0,05$ ) os teores de cafeína das amostras, sendo novamente as amostras provenientes de Cascavel/PR, obtidas tanto na extração com solução aquosa acidificada quanto na solução hidroetanólica, as que apresentaram os maiores valores ( $3,43 \pm 0,08$  g 100 g<sup>-1</sup> e  $3,30 \pm 0,14$  g 100 g<sup>-1</sup>, respectivamente).

Bisognin *et al.* (2019) avaliaram o teor de compostos bioativos de folhas de erva-mate em diferentes condições de extração (tempo e solvente) em seu estudo. Obtiveram leituras, para flavonoides, com tempo de extração de 45 minutos, com emprego de um solvente hidroetanólico, valores, em média, de  $19,21 \pm 0,61$  mg ECAT 100 g<sup>-1</sup> (mg de equivalente de catequina por grama de amostra). Apesar de os valores obtidos no presente estudo terem sido superiores aos reportados pelos autores, os dois resultados apontam para um teor reduzido de flavonoides nesse tipo de matriz. Santos *et al.* (2022), que avaliaram compostos bioativos de extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, encontraram, para análise de flavonoides, teores médios de  $4,41 \pm 0,56$  g EQ 100 g<sup>-1</sup>, valores superiores aos encontrados na matriz desse estudo. Como os autores utilizaram um soxhlet para extração, por 6 horas, e ainda rota evaporaram o extrato por mais 6 horas, é possível que essas condições de extração tenham favorecido a solubilização maior dos flavonoides.

Novamente, com relação ao emprego de solução de ácido fosfórico, não foi possível perceber impacto positivo na composição de flavonoides, isso fica evidenciado no fato de que, os dois maiores resultados foram obtidos nos dois solventes onde não foi realizada a acidificação. E com relação a origem das matrizes, apenas quando do emprego de solvente sem acidificação, a amostra de Santa Maria do Oeste/PR apresentou maiores teores ( $p < 0,05$ ). Para as análises de teor de compostos fenólicos totais, a acidificação não apresentou diferença significativa entre

os valores obtidos ( $p > 0,05$ ), o que sugere que o uso de ácido fosfórico não contribuiu positivamente para a extração de compostos fenólicos nas condições estudadas. Ao se analisar a diferença entre as duas amostras, a amostra de Cascavel/PR apresentou maiores valores para as três variações no solvente empregado, inclusive com diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Tonet (2017), em seu estudo, obteve o valor de  $10,40 \pm 0,00$  g EAG  $100 \text{ g}^{-1}$  de amostra para a caracterização de compostos fenólicos totais, sendo, novamente, valores similares aos encontrados no presente estudo. Diversos estudos apontam para uma relação entre o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante da matriz (VELIOGLU *et al.* 1998; KATSUBE *et al.* 2004; CHEN *et al.* 2008).

Seguindo os resultados de atividade antioxidante, para a análise de ABTS, é possível perceber que as amostras acidificadas não apresentaram melhores resultados do que o solvente sem acidificação, inclusive com base na análise estatística, os resultados não variaram significativamente ( $p > 0,05$ ). E com relação a origem das amostras, novamente não existiu diferença significativa.

Para a análise de DPPH também a acidificação não se mostrou efetiva, apesar do maior valor ter sido encontrado em uma amostra acidificada, as respostas não apresentaram diferença significativa entre si ( $p > 0,05$ ). O mesmo pode ser percebido na análise de redução do íon ferro (FRAP), em que a acidificação não apresentou significativa diferença na análise.

Dudonné *et al.* (2009), encontraram, em seu estudo, que visava caracterizar a atividade biológica de diversos extratos vegetais, avaliando assim a aplicabilidade desses extratos, por ABTS e DPPH, de extrato de folhas de erva-mate, que foram preparados com uma infusão simples, com água destilada a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , e seco em seguida com emprego de rota evaporação, até que se obtivesse um pó, valores de  $32,73 \pm 3,51$  g ET  $100 \text{ g}^{-1}$  de amostra, e  $71,75 \pm 1,22$  g ET  $100 \text{ g}^{-1}$  de amostra, respectivamente, valores esses que são significativamente distintos aos encontrados por esse estudo, isso é dado pela diferença no método de extração.

Ainda, Dudonné *et al.* (2009), em seu estudo, também caracterizaram o poder de redução por meio da redução do íon ferro (FRAP), obtendo assim um resultado de  $4,67 \pm 0,08$  (mMol  $\text{Fe}^{2+}$  / g de amostra), valor pouco distinto aos encontrados por esse estudo, que variaram de 4,7 a 6,2 (mMol  $\text{Fe}^{2+}$  / g de amostra) ou, de 67 a 86 (g EQ  $\text{Fe(II)}$  / 100 g amostra).

Portanto, ressalta-se os altos teores de compostos bioativos das matrizes testadas, especialmente o 5-ACQ, cafeína e compostos fenólicos totais na erva-mate de Cascavel/PR. O solvente hidroetanólico 30% em extração assistida por ultrassom mostrou ser a melhor alternativa entre as testadas para extração dos compostos bioativos (5-ACQ, cafeína, compostos flavonóides totais e fenólicos totais, com consequente melhor atividade antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP, quando comparado com o solvente acidificado, sendo portanto, produzido em maior escala a partir das duas matrizes, para posterior secagem em atomizador, testes de atividade antimicrobiana e seleção para aplicação em produto cárneo.

Após secagem, o extrato de Cascavel apresentou teor de 5-ACQ de  $22,39 \pm 0,26 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  e de cafeína de  $10,85 \pm 0,19 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ . Enquanto o de Santa Maria apresentou  $14,39 \pm 0,61 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  e  $6,87 \pm 0,18 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente. Constatando, ser a matriz de Cascavel a de maior presença de 5-ACQ e cafeína ( $p < 0,05$ ), compostos reconhecidamente de alta atividade antioxidante e antimicrobiana (CORSO; VIGNOLI; BENASSI, 2016; FARAH; DONANGELO, 2006).

## 5.2 Atividade antimicrobiana in vitro dos extratos de erva-mate

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados, respectivamente, para atividade antimicrobiana e bacteriostática para a amostra do extrato etanólico 30% seco obtido de erva-mate procedente de Cascavel e Santa Maria, e de um antibiótico comercial, o levofloxacino, para comparação, para três microrganismos testados.

**Tabela 6 - Resultados para caracterização de atividade antimicrobiana e bacteriostática de extrato hidroetanólico (30%) de erva-mate e do levofloxacino**

Microrganismo	Erva-mate				Levofloxacino	
	MIC (mg mL <sup>-1</sup> )		MBC (mg mL <sup>-1</sup> )		MIC (mg mL <sup>-1</sup> )	MBC (mg mL <sup>-1</sup> )
	C	SM	C	SM		
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 43888)	6,25	12,5	12,5	25	$<3,1 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-3}$
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	3,13	12,5	12,5	25	$1,25 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-3}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	3,13	12,5	12,5	12,5	$<3,1 \times 10^{-6}$	$4 \times 10^{-3}$

**Nota: C: Amostra do município de Cascavel/PR. SM: Amostra do município de Santa Maria do Oeste/PR. MIC: Concentração Inibitória Mínima. MBC: Concentração Bactericida Mínima.**

**Fonte: Autoria própria (2022)**

Em relação a análise de MIC para *Escherichia coli*, a inibição com extrato hidroetanólico da erva-mate procedente de Cascavel, ocorreu com 50% da concentração em reação a erva-mate de Santa Maria, e para os micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* apenas 25%. Já para a análise de MBC, também obteve-se resultado melhores, para os micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* para o extrato da erva-mate de Cascavel, o que deve ter ocorrido devido a melhor composição em substâncias bioativas em especial o 5-ACQ.

É possível compreender a viabilidade do emprego do extrato como agente antimicrobiano a partir desses resultados, Tonet (2017), quando caracterizou atividade antimicrobiana de extrato de erva-mate obtido de forma similar a esse estudo, encontrou MIC de 10 mg / mL para *Escherichia coli* e *Salmonella* Tiphy, e 5 mg / mL para *Staphylococcus aureus*.

O controle microbiano é fundamental em alimentos, principalmente para os produtos cárneos, já que são uma conhecida fonte de deterioração em alimentos, causando as chamadas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). *Staphylococcus aureus*, Clostrídios sulfito redutores a 42 °C e *Bacillus cereus* são organismos causadores de intoxicação em alimentos, já *E. coli*, Salmonelas e Shigelas são os maiores agentes causadores de infecções (MALACRIDA *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2018).

### **5.3 Aplicação do extrato de extrato hidroetanólico 30% de erva-mate em produto cárneo cru**

Considerando os resultados para teor de compostos bioativos, a atividade antioxidante determinada pelos diferentes métodos, e a atividade antimicrobiana e bactericida mínimo, optou-se por aplicar no produto cárneo frescal, linguiça toscana, o extrato de erva-mate hidroetanólico 30% (v/v) de origem de Cascavel/PR, seco em *spray dryer*, em concentração equivalente ao antioxidante comercial (eritorbato de sódio) (0,5%) e em uma concentração quatro vezes superior ao antioxidante comercial (2%). Na sequência serão relatados os resultados obtidos quanto a caracterização de composição centesimal e perda de peso das formulações desenvolvidas, bem como cor instrumental, pH, perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa por TBARS durante vida útil do produto.



### 5.3.1 Composição centesimal das formulações de linguiça toscana

Na Tabela 7 são apresentados os resultados da composição centesimal da linguiça toscana frescal controle, desenvolvida com o antioxidante sintético eritorbato de sódio, e as formulações testes com 0,5 e 2% de extrato hidroalcolólico (30%) de erva-mate. Para umidade, as médias variaram entre 61,83 e 63,35 g 100 g<sup>-1</sup>, sendo que não houve diferença significativa entre formulações com erva-mate e formulação controle ( $p > 0,05$ ). Todas as amostras estão de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2000) para o parâmetro umidade (máximo 70%). Em relação ao teor de cinzas as amostras apresentaram de 3,56 a 3,73 g 100 g<sup>-1</sup> e também não apresentaram diferença entre si ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 7 – Composição centesimal (g 100 g<sup>-1</sup>) de linguiça toscana elaborada com extrato de erva mate e antioxidante comercial**

Amostra	Umidade	Cinzas	Proteínas	Lipídios
FC	61,96 ± 1,09 <sup>a</sup>	3,73 ± 0,15 <sup>a</sup>	13,86 ± 0,77 <sup>a</sup>	21,21 ± 0,61 <sup>a</sup>
F1	63,35 ± 1,20 <sup>a</sup>	3,64 ± 0,05 <sup>a</sup>	14,56 ± 0,59 <sup>a</sup>	21,33 ± 1,30 <sup>a</sup>
F2	61,83 ± 3,29 <sup>a</sup>	3,56 ± 0,19 <sup>a</sup>	13,36 ± 0,63 <sup>a</sup>	22,73 ± 0,36 <sup>a</sup>

**FC: Formulação Controle, desenvolvida com antioxidante comercial. F1: Formulação 1, desenvolvida com 0,5% m/m de extrato de erva mate. F2: Formulação 2, desenvolvida com 2% m/m de extrato de erva mate. Resultado expresso pela média ± desvio padrão (n=3); médias com letras iguais sobrescritas nas colunas indicam que não há diferença significativa entre as formulações pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).**

**Fonte: Autoria própria (2022)**

Na Tabela 7 são ainda apresentados valores encontrados na análise de proteína, que variaram de 13,26 e 14,56 g 100 g<sup>-1</sup> e para a análise de lipídios, cujos valores ficaram compreendidos entre 18,08 (Formulação Controle) a 23,92 g 100 g<sup>-1</sup> (Formulação 2). Para ambos os constituintes químicos, estatisticamente, as três amostras não variaram significativamente ( $p < 0,05$ ), similaridade esta esperada considerando que as três foram originadas de uma mesma formulação base (massa), tendo como única variação o antioxidante. As quantificações obtidas para os teores de proteína e lipídios também estão em consonância com a legislação nacional vigente, a qual estabelece, teor máximo de gordura de 30% e teor mínimo de proteína de 12% (BRASIL, 2000).

### 5.3.2 Perda de peso das amostras no cozimento

Após elaboração, as três formulações tiveram a determinação de perda de peso por cozimento (assamento) efetuada. Os resultados indicaram maior perda de peso para a amostra contendo 2% de extrato de erva-mate ( $40,61\% \pm 0,59$ ) ( $p < 0,05$ ), seguido pela formulação contendo 0,5% de extrato ( $43,92\% \pm 1,56$ ) e da formulação controle ( $37,88\% \pm 0,33$ ), respectivamente, ocorrendo, portanto, uma perda maior ( $p < 0,05$ ) nas amostras adicionadas do extrato de erva-mate.

### 5.3.3 Alterações na cor das amostras com uso do extrato de erva-mate durante vida útil e após cozimento

Os resultados da análise de cor para as amostras FC, F1 e F2, nos diferentes intervalos de tempo (0, 15 e 30 dias) e após assamento, estão apresentados na Tabela 8. Pode-se observar uma diminuição nos valores do parâmetro L com a adição do extrato de erva-mate ( $p < 0,05$ ), ou seja, o mesmo, nas concentrações utilizadas proporcionou um escurecimento das amostras, sendo a amostra com 2% de extrato mais escura ( $p < 0,05$ ), comportamento que pode ser visualizado durante todo o período de vida útil das linguças. No entanto, após cozimento não houve diferença significativa entre a amostra controle e a amostra com 0,5% de extrato para este parâmetro ( $p > 0,05$ ). Em relação ao tempo de vida útil na formulação controle e na formulação com 2% de extrato, não se observaram alterações no parâmetro L ( $p > 0,05$ ) comparando-se as amostras no 15° ou 30° dia em relação ao dia 0, no entanto, para a formulação com 0,5% de extrato observou-se uma diminuição significativa deste parâmetro a partir do 15° dia de armazenamento.

**Tabela 8 – Análise colorimétrica para as diferentes formulações para diferentes intervalos de tempo, e ainda, após cocção**

Componentes de cor	FC	F1	F2
L (t=0 dias)	72,49 ± 0,92 <sup>aA</sup>	62,76 ± 0,49 <sup>bA</sup>	48,46 ± 1,29 <sup>cAB</sup>
L (15 dias)	68,86 ± 2,98 <sup>aA</sup>	60,04 ± 1,18 <sup>bAB</sup>	49,32 ± 0,76 <sup>cA</sup>
L (30 dias)	72,26 ± 0,34 <sup>aA</sup>	57,36 ± 1,29 <sup>bB</sup>	46,24 ± 0,74 <sup>cB</sup>
L (pós cozimento)	60,63 ± 0,85 <sup>aB</sup>	56,36 ± 2,68 <sup>aB</sup>	50,00 ± 1,56 <sup>bA</sup>
a* (t=0 dias)	7,27 ± 0,22 <sup>aA</sup>	-0,22 ± 0,42 <sup>bC</sup>	-2,10 ± 0,58 <sup>cA</sup>
a* (15 dias)	7,92 ± 0,88 <sup>aA</sup>	3,65 ± 0,41 <sup>bA</sup>	-1,4 ± 0,27 <sup>cA</sup>
a* (30 dias)	7,14 ± 0,19 <sup>aA</sup>	1,58 ± 0,37 <sup>bB</sup>	-1,56 ± 0,11 <sup>cA</sup>
a* (pós cozimento)	7,13 ± 0,20 <sup>aA</sup>	1,94 ± 0,99 <sup>bB</sup>	-1,62 ± 0,22 <sup>cA</sup>
b* (t=0 dias)	18,42 ± 0,31 <sup>cA</sup>	22,01 ± 0,57 <sup>bAB</sup>	24,85 ± 1,48 <sup>aB</sup>
b* (15 dias)	18,59 ± 0,95 <sup>cA</sup>	24,46 ± 0,34 <sup>bA</sup>	27,73 ± 0,54 <sup>aA</sup>
b* (30 dias)	17,54 ± 0,46 <sup>cA</sup>	19,76 ± 0,40 <sup>bB</sup>	25,75 ± 0,11 <sup>aAB</sup>
b* (pós cozimento)	12,5 ± 0,30 <sup>cB</sup>	19,62 ± 2,35 <sup>bB</sup>	24,22 ± 0,83 <sup>aB</sup>

**Nota:** FC: Formulação Controle, com antioxidante comercial. F1: com 0,5% m/m de extrato de erva-mate. F2: com adição de 2% m/m do extrato de erva-mate. Média ± desvio padrão (n=3) seguidas de diferentes letras minúsculas sobrescritas indicam diferença significativa entre as amostras (linhas), e letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença significativa nos tempos analisados, para uma mesma amostra (colunas) pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Fonte: Aúria própria (2022)

Com relação aos parâmetros a\* e b\* que definem a tonalidade cromática, para a\* pode-se observar conforme o esperado, que a adição de extrato de erva-mate de tonalidade verde, proporcionasse uma diminuição nos valores deste parâmetro. A amostra com 2% de extrato apresentou-se mais esverdeada (p < 0,05), e mesmo a amostra com 0,5% teve cor mais verde do que a amostra controle em todos os tempos analisado e também após o processo de cozimento (p < 0,05). O mesmo comportamento observou-se para o parâmetro b\*, relacionado a tonalidade amarelada. Portanto, a adição de extrato de erva-mate mesmo na concentração mais baixa (0,5%) aumentou significativamente os tons verde e amarelo do produto linguíça toscana, conforme pode ser constatado na Figura 5. Resultado similar foi observado por Camel *et al.* (2012) para sobrecoxas de frango submetidas a diferentes tratamentos (sem condimentos; com sal; sal e sálvia; sal, sálvia e extrato de erva-mate (0,125%); sal e extrato (0,125%); sal, sálvia e extrato (0,25%) e sal e extrato (0,25%)) e analisadas na forma crua, assada, A adição dos extratos alterou significativamente (p < 0,05) a cor b\* nas amostras reaquentadas e a cor L nas amostras armazenadas e reaquentadas.

Em relação ao tempo de armazenamento não é possível observar correlações entre as tonalidades, para ambos os parâmetros com o avançar do tempo (Tabela 8).

**Figura 5 – Formulações de linguiça toscana, controle (com antioxidante comercial), F1 com 0,5 e F2 com 2% de extrato seco de erva-mate respectivamente, após embutimento e embalagem a vácuo (a) e após cozimento (b)**



Fonte: Autoria própria (2022).

#### 5.3.4 Alterações do pH das amostras durante vida útil e após cozimento

Na Tabela 9 estão apresentados os valores de pH das três formulações, bem como a variação do pH nos intervalos de tempo testados e após assamento. No geral, as variações de pH oscilaram na faixa de 5,55 a 5,98 para os três tratamentos durante os 30 dias de armazenamento, valores que estão adequados ao produto fresco e próximos aos valores citados pela literatura (BRUM, 2009).

**Tabela 9 – pH das formulações de linguiça toscana controle e com adição de extrato hidroetanólico (30%) de erva-mate durante vida útil e após cozimento**

Amostra	pH (t= 0 dias)	pH (t = 15 dias)	pH (t = 30 dias)	pH (Assada)
FC	5,68 ± 0,09 <sup>cB</sup>	5,81 ± 0,01 <sup>bB</sup>	5,55 ± 0,01 <sup>dC</sup>	6,08 ± 0,01 <sup>aB</sup>
F1	5,85 ± 0,01 <sup>cA</sup>	5,88 ± 0,01 <sup>bB</sup>	5,73 ± 0,01 <sup>dA</sup>	6,13 ± 0,01 <sup>aAB</sup>
F2	5,83 ± 0,01 <sup>cA</sup>	5,98 ± 0,01 <sup>bA</sup>	5,67 ± 0,01 <sup>dB</sup>	6,20 ± 0,05 <sup>aA</sup>

**Nota:** FC: Formulação Controle, com conservante comercial. F1: Formulação 1, com 0,5% m/m de extrato de erva-mate. F2: com 2% m/m de extrato de erva-mate. Médias ± desvio padrão (n=3) seguidas de letras maiúsculas diferentes sobrescritas indicam diferença significativa entre as amostras (coluna), e, letras minúsculas, quando diferentes, indicam diferença significativa entre os dias de análise para a mesma amostra (linha) pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Fonte: Autoria própria (2022)

Observou-se que as amostras adicionadas do extrato de erva-mate (F1 e F2) apresentaram, no geral, pH superior a amostra controle ( $p < 0,05$ ). E em relação ao

tempo de armazenamento, é possível notar que as três amostras sofreram um aumento do pH entre o tempo 0 e 15 dias ( $p < 0,05$ ), e após, uma redução para os três tratamentos aos 30 dias de armazenamento.

Brum (2009), avaliou a aplicação de extrato hidroetanólico de erva-mate em linguiça toscana, e também verificou uma redução do pH ao transcorrer do tempo de armazenamento, variando de 5,99 no tempo 0, até 5,53 no tempo 12, e no tempo 20 dias, os valores tiveram um acréscimo, chegando à 6,39. Segundo o autor, a redução dos valores de pH é justificada pela ocorrência de um processo fermentativo, que segundo Beck *et al.* (2021) pode ser provocado pelo crescimento de bactérias lácticas no produto.

Já a elevação do pH pode ocorrer pelo desenvolvimento de algumas classes de microrganismos gram negativos, como Enterobacteriaceae e Pseudomonas, além de alguns tipos de bolores e leveduras, que ocasionam degradação de proteínas, e consequente formação de amônia (NYCHAS; DROSINOS; BOARD, 1998; TERRA; BRUM, 1988; VERMA; SAHOO 2000). Esse fato foi observado no estudo de Scapin *et al.* (2014), que avaliaram o emprego de extrato de semente de chia como antioxidante natural em linguiça frescal. Os resultados variaram, no caso do extrato com 2% de semente de chia, de 6,21 no dia 0, até 6,54 no dia 28.

#### 5.3.5 Estabilidade oxidativa das formulações de linguiça toscana controle e adicionadas de extrato de erva-mate durante vida útil

A Tabela 10 apresenta os resultados encontrados para a análise de oxidação (TBARS) no transcorrer de 0, 15 e 30 dias para a formulação controle com antioxidante comercial e as amostras desenvolvidas com antioxidante natural a base de extrato hidroalcolico (30%) de erva-mate (F1 e F2). As leituras para o tempo 0 e 15 foram inferiores ao ponto de menor concentração da curva de calibração, estimando-se, portanto, valores inferiores à  $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$  para as três formulações. No tempo 30 é possível notar a formação de malonaldeído, mas em baixas concentrações (0,879 a  $0,890 \text{ mg kg}^{-1}$  de amostra), sem diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ), indicando assim a estabilidade dos produtos com relação à oxidação, pois de acordo com Bloukas, Paneras e Fournitzis (1997), os limites para que seja sensorialmente perceptível a oxidação, para produtos cárneos processados, são os valores para

malonaldeído superiores a 1 mg kg<sup>-1</sup> de amostra, sendo assim, os valores apresentados indicam estabilidade das formulações quanto a oxidação.

**Tabela 10 – Resultado para a análise de TBARS, realizada em diferentes intervalos de tempo**

Amostra	Malonaldeído (mg kg <sup>-1</sup> )		
	0 dias	15 dias	30 dias
FC	<0,01	<0,01	0,890 ± 0,050 <sup>a</sup>
F1	<0,01	<0,01	0,887 ± 0,132 <sup>a</sup>
F2	<0,01	<0,01	0,879 ± 0,099 <sup>a</sup>

**FC: Formulação Controle, desenvolvida com a utilização de conservante comercial. F1: Formulação 1, com a adição de 0,5% m/m. F2: Formulação 2, com 2% m/m de extrato de erva mate. t0: dia 0, t15: dia 15, t30: dia 30. Resultado apresentado pela média ± desvio padrão com n=3. Respostas com diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa entre as amostras (coluna), conforme teste de Tukey, com um grau de significância de p≤0,05.**

**Fonte: Autoria própria (2022)**

De Campos *et al.* (2007), avaliaram a utilização de extrato de erva-mate, desenvolvido a partir de uma mistura de 100 g de erva-mate em 400 g de solvente, uma mistura de álcool 95% e água (4:1 v/v), filtrado após 1 hora, e o solvente evaporado com rotaevaporador. Esse extrato foi aplicado em salame de carne suína, que armazenado a vácuo, foram avaliados quanto a formação de malonaldeído após o transcorrer de 30 e 60 dias. Os valores encontrados apontam que as amostras que utilizaram o extrato de erva-mate obtiveram teores estatisticamente menores ( $p < 0,05$ ), ainda, os valores de TBARS foram moderados, apontando assim uma baixa oxidação, não induzindo um sabor rançoso, sendo que todas as amostras, após o tempo de armazenamento de 60 dias, não alcançaram 1 mg de malonaldeído por kg de amostra.

Beal *et al.* (2011) desenvolveram salame tipo italiano fermentado com extrato de erva-mate, que foi obtido por percolação a 96 °C, a partir de 24 g de folhas de erva-mate secas e 350 mL de água, sendo posteriormente seco em atomizador. As análises foram feitas nos tempos 2, 7, 14, 21, e 60 dias de armazenamento. Os resultados mostraram que o produto se manteve estável ao transcorrer do tempo, mesmo para o tempo de 60 dias, a formação de malonaldeído foi inferior a 1 mg kg<sup>-1</sup> de amostra.

Camel *et al.* (2012) também verificou o efeito do aumento da concentração de Extrato de erva-mate contra a oxidação lipídica em sobrecoxas de frango, sendo que a amostra com 0,125% de extrato de erva-mate diferiu das amostras contendo 0,25% de extrato na condição armazenado.

Ambos os trabalhos corroboram com os resultados do presente trabalho, mostrando a possibilidade do uso de da erva-mate em produtos cárneos com efeitos positivos para proteção contra à oxidação.

### 5.3.6 Perfil de ácidos graxos

Nas Tabelas 11 e 12 são apresentados os resultados do perfil de ácidos graxos das amostras de linguiças analisadas no tempo zero e no tempo de 30 dias de armazenamento, respectivamente. Dentre os ácidos graxos majoritários observados nas formulações de linguiça tipo toscana, em ambos os tempos de armazenamento, destacam-se os ácidos oleico (18:1n-9), palmítico (16:0), linoleico (18:2n-6) e esteárico (18:0), ácidos graxos presentes em cortes suínos como pernil, lombo e toucinho (BRAGAGNOLO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2002). Resultados similares foram reportados por Monteiro *et al.* (2017) em seu estudo sobre substituição parcial de toucinho por óleo de canola em amostras de linguiça tipo toscana, bem como, por Beck *et al.* (2021) que avaliaram o perfil de ácidos graxos de amostras de linguiças frescas com redução do teor de sódio.

No tempo zero pode-se observar que as amostras de linguiça elaboradas com 2% m/m de extrato de erva-mate (F2) exibiram maiores teores de ácidos graxos saturados (AGS) (7865,5 mg 100 g<sup>-1</sup>) e monoinsaturados (AGMI) (9323,7 mg 100 g<sup>-1</sup>), diferindo das demais formulações ( $p < 0,05$ ), relacionados ao maior conteúdo de ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0) e oleico (18:1n-9), respectivamente, observado nesta formulação. No tempo de 30 dias também foram observados maiores teores de AGS e AGMI para F2, contudo, a composição dos ácidos graxos variou em função das diferentes formulações. Observa-se que o ácido graxo *trans* vacênico (18:1(t11)) foi superior nas formulações padrão e F1, diferindo significativamente da amostra F2 ( $p < 0,05$ ). Além disso, menores teores de ácido heptadecenoico (17:1n-9), oleico (18:1n-9), linolênico (18:3n-3) e eicosenoico (20:1n-9) foram observados para as formulações padrão e F1, todos ácidos graxos insaturados. Processos oxidativos durante o armazenamento de produtos cárneos podem alterar seu perfil lipídico, resultando na redução da proporção de ácidos graxos insaturados (ALONSO *et al.*, 2016).

**Tabela 11 - Perfil de ácidos graxos das amostras de linguiça tipo toscana adicionadas de diferentes antioxidantes no tempo zero de armazenamento.**

Ácido graxo	FP	F1	F2
14:0 (mirístico)	207,6 <sup>a</sup> ± 6,0	223,3 <sup>a</sup> ± 10,9	221,1 <sup>a</sup> ± 3,9
15:0 (pentadecanoico)	16,1 <sup>a</sup> ± 0,9	14,7 <sup>a</sup> ± 1,3	17,3 <sup>a</sup> ± 2,9
15:1n5 (pentadecenoico)	56,5 <sup>a</sup> ± 4,2	41,7 <sup>a</sup> ± 7,3	57,2 <sup>a</sup> ± 4,0
16:0 (palmítico)	4401,9 <sup>b</sup> ± 64,2	4490,3 <sup>b</sup> ± 35,3	4753,1 <sup>a</sup> ± 64,1
16:1n-9 (palmitoleico)	373 <sup>a</sup> ± 5,5	400,9 <sup>a</sup> ± 15,3	396,5 <sup>a</sup> ± 19,4
17:0 (heptadecanoico)	74,8 <sup>a</sup> ± 1,0	72,7 <sup>a</sup> ± 3,2	78,8 <sup>a</sup> ± 2,9
17:1n-7 (heptadecenoico)	48,8 <sup>a</sup> ± 2,1	50,7 <sup>a</sup> ± 1,4	51,9 <sup>a</sup> ± 0,9
18:0 (esteárico)	2333,8 <sup>ab</sup> ± 22,1	2219,9 <sup>b</sup> ± 110,6	2508,9 <sup>a</sup> ± 33,3
18:1(t11) (vacênico)	24,5 <sup>a</sup> ± 2,4	20,8 <sup>a</sup> ± 0,3	19,8 <sup>a</sup> ± 2,1
18:1n-9 (oleico)	7877,3 <sup>b</sup> ± 100,5	8126 <sup>b</sup> ± 75,7	8470,7 <sup>a</sup> ± 311,5
18:2n-6 (linoleico)	3591,7 <sup>a</sup> ± 141,3	3495,3 <sup>a</sup> ± 165,6	3744,4 <sup>a</sup> ± 306,2
18:3n-3 (linolênico)	138,7 <sup>a</sup> ± 10,7	142,4 <sup>a</sup> ± 8,7	172,3 <sup>a</sup> ± 17,8
20:0 (araquídico)	37,6 <sup>a</sup> ± 1,8	36,0 <sup>a</sup> ± 3,7	40,4 <sup>a</sup> ± 1,4
20:1n9 (eicosenoico)	146,3 <sup>a</sup> ± 4,1	147,9 <sup>a</sup> ± 8,9	159,2 <sup>a</sup> ± 6,9
20:2n-6 (eicosadienoico)	149,7 <sup>a</sup> ± 2,8	145,7 <sup>a</sup> ± 3,4	158,5 <sup>a</sup> ± 6,2
20:3n-6 (di-homo-gama-linoleico)	38,1 <sup>a</sup> ± 0,8	35,7 <sup>a</sup> ± 1,4	41,0 <sup>a</sup> ± 4,5
22:0 (behênico)	170,8 <sup>a</sup> ± 10,2	139,7 <sup>b</sup> ± 6,0	165 <sup>b</sup> ± 17,2
24:0 (lignocérico)	38,1 <sup>a</sup> ± 2,8	33,3 <sup>a</sup> ± 0,9	42,4 <sup>a</sup> ± 5,4
ΣAGS	7280,8 <sup>b</sup> ± 87,3	7229,9 <sup>b</sup> ± 106,7	7865,5 <sup>a</sup> ± 0,1
ΣAGMI	8526,3 <sup>b</sup> ± 106,2	8787,9 <sup>b</sup> ± 76,9	9323,7 <sup>a</sup> ± 239,1
ΣAGPI	3918,2 <sup>a</sup> ± 155,0	3819,1 <sup>a</sup> ± 173,7	3949,8 <sup>a</sup> ± 239,0
Σn-3	138,7 <sup>a</sup> ± 10,7	142,4 <sup>a</sup> ± 8,7	163,7 <sup>a</sup> ± 13,7
Σn-6	3779,5 <sup>a</sup> ± 144,4	3676,7 <sup>a</sup> ± 165,1	3786,1 <sup>a</sup> ± 225,3

**FC: Formulação Controle, desenvolvida com a utilização de conservante comercial. F1: Formulação 1, com a adição de 0,5% m/m de extrato de erva mate. F2: Formulação 2, com 2% m/m de extrato de erva mate. ΣAGS: somatória dos ácidos graxos saturados, ΣAGMI: somatório dos ácidos graxos monoinsaturados, ΣAGPI: somatório dos ácidos graxos poli-insaturados, Σn-3: somatório dos ácidos graxos ômega 3, Σn-6: somatório dos ácidos graxos ômega 6. Média ± desvio padrão (n = 3). Respostas com diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).**

Fonte: Autoria própria (2022).

Apesar de não haver diferença significativa entre as formulações quanto a análise de TBARS, o perfil de ácidos graxos observado sugere que a adição do extrato de erva-mate em sua maior concentração (2% m/m) pode ter contribuído para a redução da oxidação dos ácidos graxos insaturados reportados acima, quando comparada às demais formulações.

**Tabela 12 - Perfil de ácidos graxos das amostras de linguiça tipo toscana adicionadas de diferentes antioxidantes no tempo 30 dias de armazenamento.**

(Continua...)

Ácido graxo	FP	F1	F2
14:0 (mirístico)	207,8 <sup>a</sup> ± 6,3	207,0 <sup>a</sup> ± 1,8	225,4 <sup>a</sup> ± 1,3
15:0 (pentadecanoico)	14,3 <sup>a</sup> ± 0,7	16,6 <sup>a</sup> ± 0,5	15,6 <sup>a</sup> ± 0,6
15:1n5 (pentadecenoico)	47,3 <sup>b</sup> ± 7,6	77,2 <sup>a</sup> ± 6,8	50,6 <sup>b</sup> ± 5,1
16:0 (palmítico)	4406,3 <sup>b</sup> ± 39,7	4451,6 <sup>b</sup> ± 16,6	4765,4 <sup>a</sup> ± 76,6
16:1n-9 (palmitoleico)	387,2 <sup>a</sup> ± 18,9	371,9 <sup>a</sup> ± 9,0	408,0 <sup>a</sup> ± 22,6
17:0 (heptadecanoico)	71 <sup>a</sup> ± 3,6	75,3 <sup>a</sup> ± 2,2	79,3 <sup>a</sup> ± 0,2
17:1n-7 (heptadecenoico)	47 <sup>b</sup> ± 1,1	47,26 <sup>b</sup> ± 1,2	53,7 <sup>a</sup> ± 1,5
18:0 (esteárico)	2270,6 <sup>a</sup> ± 119,6	2374,6 <sup>a</sup> ± 29,6	2493,8 <sup>a</sup> ± 51,7
18:1(t11) (vacênico)	37,1 <sup>a</sup> ± 1,7	21,1 <sup>b</sup> ± 0,5	22,0 <sup>b</sup> ± 0,1
18:1n-9 (oleico)	8015,3 <sup>b</sup> ± 70,1	7898,6 <sup>b</sup> ± 24,7	8583,1 <sup>a</sup> ± 81,2



Ácido graxo	(Conclusão)		
	FP	F1	F2
18:2n-6 (linoleico)	3547,9 <sup>a</sup> ± 227,6	3555,0 <sup>a</sup> ± 87,9	3659,7 <sup>a</sup> ± 104,6
18:3n-3 (linolênico)	133,7 <sup>b</sup> ± 9,9	142,5 <sup>b</sup> ± 6,5	167,3 <sup>a</sup> ± 4,6
20:0 (araquídico)	36,7 ± 2,0	38,73 ± 0,6	43,2 ± 3,2
20:1n9 (eicosenoico)	144,4 <sup>b</sup> ± 7,5	149,71 <sup>b</sup> ± 1,2	161,0 <sup>a</sup> ± 4,3
20:2n-6 (eicosadienoico)	147,8 ± 4,4	149,1 ± 4,1	162,4 ± 2,6
20:3n-6 (di-homo-gama-linoleico)	35,7 <sup>b</sup> ± 2,4	40,1 <sup>a</sup> ± 2,7	39,7 <sup>ab</sup> ± 1,6
22:0 (behênico)	145,6 <sup>b</sup> ± 19,3	189,3 <sup>a</sup> ± 25,4	164,8 <sup>b</sup> ± 12,1
24:0 (lignocérico)	35,2 <sup>a</sup> ± 3,2	40,2 <sup>a</sup> ± 4,6	38,9 <sup>a</sup> ± 2,4
ΣAGS	7283,0 <sup>b</sup> ± 74,6	7402,6 <sup>b</sup> ± 70,9	7735,9 <sup>a</sup> ± 2,8
ΣAGMI	8694,0 <sup>b</sup> ± 107,4	8573,3 <sup>b</sup> ± 51,2	9314,1 <sup>a</sup> ± 26,9
ΣAGPI	3748,3 <sup>a</sup> ± 182,0	3861,1 <sup>a</sup> ± 122,1	4088,9 <sup>a</sup> ± 24,1
Σn-3	128,4 <sup>b</sup> ± 4,7	139,90 <sup>b</sup> ± 6,6	169,9 <sup>a</sup> ± 1,1
Σn-6	3620,0 <sup>a</sup> ± 177,3	3721,2 <sup>a</sup> ± 115,5	3919,1 <sup>a</sup> ± 22,9

**FC: Formulação Controle, desenvolvida com a utilização de conservante comercial. F1: Formulação 1, com a adição de 0,5% m/m de extrato de erva mate. F2: Formulação 2, com 2% m/m de extrato de erva mate. ΣAGS: somatória dos ácidos graxos saturados, ΣAGMI: somatório dos ácidos graxos monoinsaturados, ΣAGPI: somatório dos ácidos graxos poli-insaturados, Σn-3: somatório dos ácidos graxos ômega 3, Σn-6: somatório dos ácidos graxos ômega 6.**

**Média ± desvio padrão (n = 3). Respostas com diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).**

**Fonte: Autoria própria (2022).**

## 6 CONCLUSÃO

Extratos de ervas-mate proveniente dos municípios de Cascavel/PR e Santa Maria do Oeste/PR foram obtidos em extração assistida por ultrassom com diferentes soluções extratoras. Valores de 5-ACQ variando de 3,76 a 7,61g 100 g<sup>-1</sup> e de cafeína entre 1,93 e 3,43 g 100 g<sup>-1</sup> foram obtidos nos extratos, representando um elevado teor de compostos bioativos, inclusive em comparação com outros extratos vegetais já empregados com essa mesma finalidade. Observou-se que o emprego do solvente hidroetanólico 30% foi a melhor opção dentre as testadas para extração dos compostos bioativos e consequente maior atividade antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP, sendo a amostra de Cascavel/PR a de maior teor de compostos bioativos e atividade antioxidante.

Com relação a atividade antimicrobiana, menores MIC para os microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* e menor MIB para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram obtidos, quando testado o extrato hidroetanólico da erva-mate procedente de Cascavel/PR, o qual após secagem apresentou teor de 5-ACQ médio de 22,39 g 100 g<sup>-1</sup>, portanto, selecionado para aplicação como antioxidante natural em produto cárneo frescal.

Quando aplicado o extrato hidroetanólico de erva-mate seco, nas concentrações de 0,5 (F1) e 2% (F2) no produto cárneo frescal linguiça toscana, observou-se maior perda de peso no cozimento, em especial para F1 (43%) se comparado a uma amostra controle (FC: com antioxidante sintético comercial). A medida instrumental de cor demonstrou menor valor dos parâmetros L e a\* e maior de b\* para F1 e F2, devido a coloração esverdeada do extrato. Entretanto, ambas as amostras apresentaram estabilidade oxidativa similar a FC, com baixos índices de formação de malonaldeído, sugerindo-se uma possibilidade de testar concentrações menores de extrato a ser aplicado, afim de obter um produto com coloração mais próxima do convencional, mantendo a estabilidade oxidativa.

Contudo, mudanças significativas no perfil de ácidos graxos foram observadas nas amostras aos 30 dias de armazenamento, de modo que a F2 exibiu maiores proporções de ácidos graxos insaturados do que as demais formulações, sugerindo que a adição do extrato de erva-mate em sua maior concentração (2% m/m) pode ter impactado na redução da oxidação dos ácidos graxos insaturados, quando comparada às demais formulações.

## REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual 2020. 160 p. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2022/02/abpa-relatorio-anual-2020.pdf>. Acesso em: 07 dez. 2022. p. 160.
- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual 2015. 248 p. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2018/10/relatorio-anual-2015.pdf>. Acesso em: 07 dez. 2022.
- AHMAD, S.R.; GOKULAKRISHNAN, P. GIRIPRASAR, R.; YATOO, M.A.; Fruit based natural antioxidants in meat and meat products: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 55, n. 11, p. 1503 – 1513, 2015.
- ALBAGLI, S. Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. **Parcerias estratégicas**, v.6, n.12, p.5-20, 2010.
- ALONSO, V.; *et al.* Changes in physicochemical properties and fatty acid composition of pork following long-term frozen storage. **European Food Research and Technology**, v. 242, p. 2119-2127, 2016.
- ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A.A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, v.115, p.785- 788, 2009.
- AMANY, M. M. B.; SHAKER, M. A.; ABEER, A. K. Antioxidant activities of date pits in a model meat system. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 1, p. 223 – 227, 2012.
- AMARAL, A. B.; SOLVA, M. V. DA; LANNES, S. C. D. S. Lipid oxidation in meat: Mechanisms and protective factors - a review. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 1–15, 2018.
- ANESINI, C.; TURNER, S.; COGOI, L.; FILIP, R. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 299 – 304, 2012.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos - Teoria e prática**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2008.
- ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. **Industrial Crops and Products**, v.34, p.838-844, 2011.
- BALZAN, S.; HERNANDES, A.; REICHERT, C. L.; DONADUZZI, C.; PIRES, V. A.; GASPAROTTO, A.; CARDOZO, E. L. BALZAN, S.; HERNANDES, A.; REICHERT, C. L.; DONADUZZI, C.; PIRES, V. A.; GASPAROTTO, A.; CARDOZO, E. L. Lipidlowering effects of standardized extracts of *Ilex paraguariensis* in high-fat-diet rats. **Fitoterapia**, v. 86, p. 115-22, 2013.
- BASTOS, D. H. M.; de OLIVEIRA, D.M.; MATSUMOTO, R. L. T.; CARVALHO, P. de O.; RIBEIRO, M.L. Yerba maté: Pharmacological properties, research and

biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v.1, p. 37–46, 2007.

BASTOS, D. H. M.; FORNARI, A. C.; QUEIROZ, Y, A.; TORRES, E. A. F. S. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 399-404, 2006.

BEAL, P.; FAION, A. M.; CICHOSKI, A. J.; CANSIAN, R. L.; VALDUGA, A. T.; OLIVEIRA, D.; VALDUGA, E. Oxidative stability of fermented Italian-type sausages using mate leaves (*Ilex paraguariensis* St. Hil) extract as natural antioxidant. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. v. 62, n. 7, p. 703 – 710, 2011.

BECK, P. H. B.; *et al.* Sodium chloride reduction in fresh sausage using salt encapsulated in carnauba wax. **Meat Science**, v. 175, 108462, 2021.

BERTÉ, K. A. S.; BEUXT, M. R.; SPADA, P. K. W. D. S.; SALVADOR, M.; HOFFMANN-RIBANI, R. "Chemical composition and antioxidant activity of yerbamate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying." **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5523-5527, 2011.

BISOGNIN, D. A.; LUZ, L. V.; LENCINA, K, H.; SANTOS, C. O.; SAUTLER, C. K. Contents of total phenolics and flavonoids in and antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* leaves. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.54, e00856, 2019.

BLOUKAS, J. G.; PANERAS, E. D.; FOURNITZIS, G. C. Effect of replacing pork backfat with olive oil on processing and quality of fermented sausages. **Meat Science**. v. 45, n. 2, p. 133 – 144, 1997.

BOEIRA, C. P.; PIOVESAN, N.; SOQUETTA, M. B.; FLORES, D. C. B.; LUCAS, B. N.; ROSA, C. S.; TERRA, N. N. Extraction of bioactive compounds of lemongrass, antioxidant activity and evaluation of antimicrobial activity in fresh chicken sausage. **Ciência Rural**, v.48, n.11, 2018.

BONA, E.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BONAPACE, C. R.; WHITE, R. L.; FRIEDRICH, L. V.; BOSSO, J. A. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, timekill, and checkerboard methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 38, n. 1, p. 43-50, 2000.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1 ed., Curitiba: Appris, 2015.

BOU-MAROUN, E.; ARICHI, J.; BOOS A.; GOETZ-GRANDMONT, G. J. Synergistic extractrion of lantganoids with heterocyclic  $\beta$ -ketoenols and 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-

triazine, TPTZ. Part I: Interaction of the extractants. **Separation and Purification Technology**, v. 53, n. 1, p. 259 – 265, 2007.

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em cortes de carne suína. **Food Science and Technology**, v. 22, n. 1, p. 98-104, 2002.

BRANCO, Cátia dos Santos. **Atividade anticonvulsivante e antioxidante de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) orgânica e convencional e seu efeito sobre o comportamento de ratos wistar**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, 2014.

BRASIL. 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. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05 mar. 2000.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 466, de 10 de fevereiro de 2021. Estabelece os coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso na produção de alimentos e ingredientes na função de solventes de extração e processamento. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 ed., seção 1, p.105, 17 fev. 2021.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. Characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393–405, 2007

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 1-17, 1999.

BRUM, E. B. **Antioxidante natural de marcela (*Achrocline satureioides*) e de erva mate (*Ilex paraguariensis*) na elaboração de linguiça Toscana**. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, 2009.

BRUSOTTI, G.; CESARI, I.; DENTAMARO, A.; CACCIALANZA, G.; MASSOLINI, G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 218-228, 2014.

BUTIUK, A.P.; MARTOS, M.A.; ADACHI, O.; HOURS, R.A. Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Effect of plant fraction, processing step and harvesting season. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, p. 27–33, 2016

CAMEL, M.; BECAGATTO, M. G.; VALDUGA, A. T.; CICHOSKI, A. J.; TONIAZZO, G.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA. Influência do potencial antioxidante de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em frango assado, armazenado e reaquecido. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 23, n. 2, p. 297-305, 2012.

CAMPÊLO, M.C.S. **Uso de conservadores naturais na elaboração de carne de sol com teores reduzidos de cloreto de sódio**. 2016. 71 f. Dissertação (Mestrado)

- Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2016.

CARDOZO JUNIOR, E.L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p.440-454, 2016.

CAROCHO, M.; BARREIRA, J. C. M.; BENTO, A., FERNÁNDEZ-RUIZ, V., MORALES, P., FERREIRA, I.C.F.R. Chestnut and lemon balm based ingredients as natural preserving agents of the nutritional profile in matured “Serra da Estrela” cheese. **Food Chemistry**. v. 204, p. 185–193, 2016.

CAROCHO, M.; BARREIRO, M. F.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 377-399, 2014.

CORSO, M. P.; VIGNOLI, J. A.; BENASSI, M. T. Development of an instant coffee enriched with chlorogenic acids. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 3, p. 1380–1388, 2016.

CHEN, X. N.; FAN, J. F.; YUE, X.; WU, X. R.; LI, L. T. Radical scavenging activity and phenolic compounds in persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Mopan). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 1, p. 24-28, 2008.n

CORREA, H. A. M. **Compostos bioativos de extratos naturais: combinação de processos de extração com dióxido de carbono supercrítico, etanol e água**. 2012. 253 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos 2010.

COSTA, D., E, M.; RACANICCI, A. M. C.; SANTANA, A. P. Atividade antimicrobiana de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) contra microrganismos isolados da carne de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 18, p 1-7, 2017.

COWAN, M. M. Plant product as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology**. v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

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

CROCETTI, Z. S. **Formação sócio espacial do Paraná**. 2012. 355 f. Tese (doutorado em Geografia), Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Filosofia e Ciências Humanas. Programa de Pós-Graduação em Geografia, UFSC. Santa Catarina. 2012.

DE CAMPOS, R. M. L.; HIERRO, E.; ORDÓÑEZ, J. A.; BERTOL, T. M.; TERRA, N. N.; de la HOZ, L. Fatty acid and volatile compounds from salami manufactured with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract and pork back fat and meat from pigs fed on diets with partial replacement of maize with rice bran. **Food Chemistry**, v. 103, n. 1, p. 1159 – 1167, 2007.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 33-40, 2004.

DELAGE, E.; BOHUON, G.; BARON, A.; DRILLEAU, J.-F. High-performance liquid chromatography of the phenolic compounds in the juice of some French cider apple varieties. **Journal of Chromatography A**, v. 555, p. 125–136, 1991.

DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 7, p. 1184 – 1187, 1959.

DUDONNÉ, S.; VITRAC, X.; COUTIÈRE, P.; WOILLET, M. MÉRILLON, J. M. comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, n. 1, p 1768 – 1774. 2009.

EFIG, L. C.; CALIARI, T. K.; NAKASHIMA, T.; FREITAS, R. J. S. Caracterização química e capacidade antioxidante da erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Boletim do Centro de pesquisa de processamento de alimentos**. Curitiba, v. 27, n. 2, p. 241-246. 2009.

EMBRAPA. Rastreabilidade e certificação de suínos no Brasil. **2ª Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína**, p. 452, 2002.

FALOWO, Andrew B.; FAYEMI, Peter O.; MUCHENJE, V. Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. **Food Research International**, v. 64, p. 171-181, 2014.

FAO. Overview of global meat market developments in 2019. **Meat Market Review**, n. April, p. 1–11, 2020.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p. 23–36, 2006

FERNANDES, C. E. F.; SCAPINELLO, J. BOHN, A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; MAGRO, J. D.; PALLIGA, M. OLIVEIRA, J. V.; TRES, M. V. Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from erva-mate (*Ilex paraguariensis*) fruit using compressed propane and supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 1, p. 98-104, 2017.

FERNANDES, L. A. **Antioxidantes naturais para aplicação em alimentos**. 2019. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, 2019.

FESTCH, V. T. **Obtenção de extrato de café para aplicação como antioxidante natural em linguiça toscana**. 2021. 115 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2021.

FIGUEIREDO, I. L.; *et al.* Fast derivatization of fatty acids in different meat samples for gas chromatography analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1456, p. 235-241, 2016.

FILGUEIRAS, A.V.; CAPELO, J.L.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 53, p. 433-441, 2000.

FILIPI, R.; LÓPES, P.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Mate substitute or adulterants: study of xanthine content. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 1, p. 129 – 131.

FOWLER, Z.L.; BARON, C. M.; PANEPINTO, J. C.; KOFFAS, M. A. Melanization of flavonoids by fungal and bacterial laccases. **Yeast**, v. 28, n. 3, p. 181-188, 2011.

FRANCISCO, N. S.; *et al.* Características físico-químicas de linguiça de frango elaborada com fibra de trigo e colágeno bovino. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 17, p. 551-558, 2013.

FREDHOLM, B.; Battig, K.; Holmén, J.; Nehlig, A.; Zvartau, E. E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological Reviews**, v. 51, p. 83-133, 1999.

FUJIOKA, K.; SHIBAMOTO, T.; Quantitation of volatiles and nonvolatiles acids in na aextract from coffee beverages: correlation with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54. p. 6054 – 6058, 2005.

GARCIA, R. G.; BURBARELLI, M. F. C.; NAAS, I. A. SGAVIOLI, S.; CARDOSO, C. A. L.; BELINTANI, R.; CALDARA, F. R. Dietary yerba mate (*Ilex paraguariensis*) influences lipid profile of broiler meat. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.20, 01-14, 2019.

GONZALEZ, M. T. N.; HAFLEY, B. S.; BOLEMAN, R. M.; MILLER, R. K.; RHEE, K. S.; KEETON, J. T. Antioxidant properties of plum concentrates and powder in procoked roast beef to reduce lipid oxidation. **Meat Science**, v. 80, n. 1, p. 997 – 1004, 2008.

GORZALCZANY, S.; FILIP, R.; ALONSO, M. D. R.; MIÑO, J.; FERRARO, F. E.; ACEVEDO, C. Choleric effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 2, p. 291-294, 2001.

GULLÓN, B.; EIBES, G.; MOREIRA, M.T.; HERRERA, R.; LABIDI, J.; GULLÓN, B. Yerba mate waste: A sustainable resource of antioxidant compounds. **Industrial Crops & Products**, v. 113, p. 398-405, 2018.

HALLIWEL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601- 617, 1995.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

HERRERO, M.; PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: chemical and functional characterization via ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. **Journal of Chromatography**, v.1217, p.2512-2520, 2010.

HONORATO, T. C.; BATISTA, E.; NASCIMENTO, K. O.; PIRES, T. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 01-11, 2014.



- HONORATO, T. C.; BATISTA, E.; NASCIMENTO, K. O.; PIRES, T. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde**, Mossoró, v. 8, n. 5, p. 01-11, 2013.
- HYGREEVA, D.; PANDEY, M. C.; RADHAKRISHNA, K. Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products. **Meat science**, v. 98, n. 1, p. 47-57, 2014.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes, ano base 2014, v. 41. 2015. 100 p. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 19 Fev 2022.
- IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, São Paulo, 2008, v. 4, p. 1020.
- JACQUES, R. A.; KRAUSE, L. C.; FREITAS LDOS, S.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V.; CARAMAO, E. B. Influence of drying methods and agronomic variables on the chemical composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) obtained from high-pressure CO2 extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 25, p. 10081-10085, 2007.
- JAPÓN-LUJÁN, R.; LUQUE-RODRÍGUEZ, J.M.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **Journal of Chromatography**. v.1108, p.76-82, 2006.
- JIANG, J. XIONG, Y. L. Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. **Meat Science**, v. 120, p. 107-117, 2016.
- KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, p. 41 – 60, 2009.
- KATSUBE, T.; TABATA, H.; OHTA, Y.; YAMASAKI, Y.; ANUURAD, E.; SHIWAKU, K.; YAMANE, Y. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2391-2396, 2004.
- KEENAN, D. F. **Pork meat quality, production and processing on**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2015.
- KHAN, I. A.; ABOURASHED, E. A. **Leung's encyclopedia of common natural ingredients: used in food, drugs and cosmetics**. 3 ed., John Wiley & Sons, 2010. 845 p.
- KIM, S. J.; CHO, A. R.; HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 112–120, 2013.
- KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206 – 220, 2005.
- KUSKOSKI, E. M.; OZCELIK, B.; SABER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, p 41 – 60, 2009.

- LIN, S. H.; KIANG, C. D. Combined physical, chemical and biological treatments of wastewater containing organics from a semiconductor plant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 97, n. 1, p. 159-171, 2003.
- LITTLEWOOD, Anthony Blair. **Gas chromatography: principles, techniques, and applications**. 2 ed., Academic press, 2013.
- MACIEL, M. A. M.; GOMES, F. E. S.; PINTO, A. C.; MAGALHÃES, S. S. S.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Aspectos sobre produtos naturais na descoberta de novos agentes antitumorais e antimutagênicos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 3, n. 1, p 38 – 59, 2013.
- MALACRIDA, A. M.; DIAS, V. H. C.; LIMA, C. L. Perfil epidemiológico das doenças bacterianas transmitidas por alimentos no Brasil. In: Anais...Simpósio de produção sustentável e saúde animal, Umuarama, Paraná. 2017.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND C.; REMESY C.; JIMENEZ L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.
- MAQSOOD, S.; BENJAKUL, S.; ABUSHELAIBI, A.; ALAM, A. Phenolic compounds and plant phenolic extracts as natural antioxidants in prevention of lipid oxidation in seafood: A detailed review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 6, p. 1125-1140, 2014.
- MAZZAFERA, P. Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguariensis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, p. 49 – 151, 1994.
- MELLO, A. C. B.; FREITAS, R. J. S.; WASZCZYNSKYJ, N.; KOEHLER, H. S.; WILLE, G. M. F.; BERTÉ, K. S. Bebida gaseificada de erva-mate verde. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.27, n. 1, p. 19 – 26, 2009.
- MELLO, N.R.; SOARES, N.F.F.; GONÇALVES, M.P.J. Nisina: Um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v.52, p.921-938, 2005.
- MELO, E. S. *et al.* Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil. **PUBVET**, v. 12, p. 131, 2018.
- MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 493-500, 2007.
- MEYER, V. R. **Practical high-performance liquid chromatography**. John Wiley & Sons, 2013.
- MICHIELS, J.A.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J.O.; DOMMES, J. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. **Food Chemistry**, v.130, p.986-993, 2012.
- MONTEIRO, G. M.; *et al.* Partial substitution of pork fat with canola oil in Toscana sausage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 44, p. 2-8, 2017.

- NEVES, L. S. S.; SANTOS, R. P. **Extração de Antocianinas da Casca de Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* Berg.) assistida por Ultrassom**. 2019. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, 2019.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over de 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311- 335, 2012.
- NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A. ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191-195, 2004.
- NOVELLO, D.; POLLONIO, M. A. R. Teores de colesterol e oxidação lipídica em hambúrguer bovino com adição de linhaça dourada e derivados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.48, n.7, p.805-808, 2013.
- NYCHAS, G. J. E.; DROSINOS, E. H.; BOARD, R. G. Chemical changes in stored meat. In: BOARD, R.G.; DAVIES, A.R. (Eds.), **The microbiology of meat and poultry**. London: Blackie Academic and Professional, 1998 (p. 288 – 326).
- OLIVEIRA, Y. M. M. de; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10., 1983, Curitiba. Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*): **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1985. p. 17-36.
- PAGLIOSA, C. M. Caracterização química do resíduo de ervas e folhas “in natura” de erva mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). Dissertação (Mestrado em ciência dos alimentos). UFSC, Florianópolis. 2009.
- PAPOTTI, V. T.; XYSTOURIS, S.; PAPAGIANNI, G.; TSIMIDOU, M. Z. “Total flavonoid” content assessment via aluminium (Al III) complexation reactions. What we really measure? **Italian Journal of Food Science**, v. 23, 2011.
- PERUMALLA, A. V. S.; HETTIARACHCHY, N. S. Green tea and grape seed extracts - Potential applications in food safety and quality. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 827–839, 2011.
- POLÔNIO, Maria Lúcia Teixeira. **Percepção de mães quanto aos riscos à saúde de seus filhos em relação ao consumo de aditivos alimentares: o caso dos pré-escolares do Município de Mesquita, RJ**. 2010. 138 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública e Meio Ambiente) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.
- PRADO, Adna. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 107 F. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de São Paulo, Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais, Piracicaba, 2009.
- PRETE, R. O.; SERAFIM, R. A.; SOUZA, D. F. M.; SAKANAKA, L. S.; YAMAGUCHI, M. M. Caracterização e aplicação de óleo de orégano como antioxidante natural em

linguiça suína frescal. **Brazilian Journal of Development**. v.6, n.7. 44109-44118, 2020.

RAHMAN, M. S. (Ed.). **Handbook of food preservation**. CRC press, 2007.

RESENDE, P. E.; de VERZA, S. G.; KAISER, S.; GOMES, L. F.; KUCHARSKI, L. C.; ORTEGA, G. G. The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 735–740, 2012.

RODRIGUES, C. E. C. **Utilização de solvente biorenovável nos processos de extração e desacidificação de óleos vegetais**. 2011. 171 f. Tese (Doutorado em Livre Docência). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; COOK, W. G; FENTON, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 7 ed. Pharmaceutical press, 2012.

RUFINO, M.S.M. *et al.* Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>\*\*</sup>. **Comunicado Técnico**, n. 128, Embrapa, 2007.

SANCHEZ-MORENO C, LARRAURI J. A, SAURA-CALIXTO F. A procedure to measure the antiradical efficient of poly phenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 76, p.270-276,1998.

SANTOS, A. F.; SCHIEFER, E. M.; SUREK, M.; MARTINS, C. A. F.; WORFEL, P. R.; SASSAKI, G. L.; SOUSA, L. M.; NOWACKI, L. C.; SOUZA, W. M.; Chemical, biological, and pharmacological evaluation of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis*, St. Hill. (Aquifoliaceae). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, 2022.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 979-990, 2012.

SCAPIN, G.; SCHIMDT, M. M.; PRESTES, R. C.; FERREIRA, S.; SILVA, A. F. C. DA ROSA, C. S. Effect of extract of chia seed (*Salvia hispanica*) as an antioxidant in fresh pork sausage. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 3, p. 1197 – 1202, 2015.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J. C.; MOSCA, S. M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for anitricoxide dependent mechanism. **Clinical Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 360-366, 2005.

SHAH, M. A.; BOSCO, S. J. D.; MIR, S. A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. **Meat Science**, v. 98, n. 1, p. 21–33, 2014.

SHAHIDI, F. Oxidative stability and shelf life of meat and meat products. Cap. 10. In: HU, M.; JACOBSEN, C. (ed.). **Oxidative stability and shelf life of foods containing oils and fats**. AOCS Press, 2016. p 373-389.

SILVA, Wedja Santana da. **Qualidade e atividade antioxidante em frutos de variedades de aceroleira**. 2008. 136 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de alimentos)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2008.

SILVA, F. A., **Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de *Ilex paraguariensis* A.St.Hil.-Aquifoliaceae (erva-mate)**. 2007, 242 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2007.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.

SILVEIRA, S. M.; LUCIANO, F. B.; FRONZA, N.; CUNHA, A.; SCHEUERMANN, G. N.; VIEIRA, C. R. W. Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7°C. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 86–93, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento**. São Paulo: Artmed, 2016.

SOXHLET, F. Soxhlet, über gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. **Polytechnisches Journal**, v. 232, p. 461–465, 1879.

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; NARAIN, N. Especiarias: uma alternativa para o controle de qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. **Higiene Alimentar**, p. 38-42, 2003.

SUN, Y.; LIU, Z.; WANG, J. Ultrasound-assisted extraction of five isoflavones from *Iris tectorum* Maxim. **Separation and Purification Technology**, v.78, p.49-54, 2011.

SWARTZ, Michael E. UPLC™: an introduction and review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 7-8, p. 1253-1263, 2005.

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

TERRA, N. N. BRUM, M. A. R. **Carne e seus derivados: técnicas de controle de qualidade**. São Paulo: Nobel, 1988.

TONET, A.; ZARA, R.; TIUMAN, T. S. Atividade biológica e quantificação de compostos bioativos em extrato de erva-mate e sua aplicação em hambúrguer de peixe. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, n. 1, p. 1 – 12.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.

ULTEE, A.; SMID, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 373-378, 2001.

- VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D.; Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 4113 – 4117. 1998.
- VERMA, S. P.; SAHOO, J. Improvement in the quality of ground chevon during refrigerated storage b tocopherol acetate preblending. **Meat Science**, v. 56, n. 4, p. 403 – 413, 2000.
- VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. M.; FLOSS, P. A. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil): O Sabor. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p.415 – 420, 2002.
- VIEIRA, M. A.; ROVARIS, A. A.; MARASCHIN, M.; SIMAS, K. N.; PAGLIOSA, C. M.; PODESTA, R. ANBONI, R. D. C.; BARRETO, P. L. M.; AMANTE, E. R. "Chemical characterization of candy made of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) residue." **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 4637- 4642, 2008.
- VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – a review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.9, p.161-169, 2008.
- WALLACE, T. E. **Food information monitoring system**. U.S. Patent n. 6.817.757, 2004.
- WHITE, R. L.; BURGESS, D. S.; MANDURU, M. BOSSO, J. A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914-1918, 1996.
- XIA, W.; LIU, P.; ZHANG, J.; CHEN, J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 2, p. 170-179, 2011.
- XU, J.; ZHOU, F.; PEI, R-S.; XU, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 174-179, 2008.
- XYNOS, N.; PAPAEFSTATHIOU, G.; PSYCHIS, M.; ARGYROPOULOU, A.; ALIGIANNIS, N.; SKALTSOUNIS, A.-L. Development of a green extraction procedure with super/ subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **Journal of Supercritical Fluids**, v.67, p.89-93, 2012.
- ZAGO, G. R.; GOTTARDO, F. M.; BILIBIO, D.; FREITAS, C. P.; BERTOL, C.; DICKEL, E. L.; SANTOS, L. R. Pomegranate (*Punica granatum* L.) peel lyophilized extract delays lipid oxidation in tuscan sausages. **Ciência Rural**, v.50, n.4, e20190689, 2020.
- ZANOELO, E. F.; BENINCÁ, C. RIBEIRO, E. Thermophysical properties of mate leaves: experimental determination and theoretical effect of moisture content. **Journal of Food Processing Engineering**. v. 34, p. 2124-2136, 2009.