



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil) EM CARNE DE PEITO DE FRANGO

DÉBORA EUCLYDES MARIANO DA COSTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
JUNHO DE 2016



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil) EM CARNE DE PEITO DE FRANGO

Aluno: DÉBORA EUCLYDES MARIANO DA COSTA

ORIENTADOR: PROFA. DRA. ALINE M. C. RACANICCI
CO-ORIENTADOR: PROFA. DRA. ANGELA PATRÍCIA SANTANA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 166/2016

BRASÍLIA/DF
JUNHO DE 2016

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

COSTA, D. E. M. **Atividade antioxidante e antimicrobiana da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) em carne de peito de frango.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2016, 93 pag. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando a reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

COSTA, D. E. M. **Atividade antioxidante e antimicrobiana da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) em carne de peito de frango.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2016, 93 pag. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2016.
1. Antioxidante. 2. Antimicrobiano. 3. TBARS. 4. Erva-mate

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil) EM CARNE DE PEITO DE FRANGO

DÉBORA EUCLYDES MARIANO DA COSTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS

APROVADA POR:

ALINE M. CALIL RACANICCI (Universidade de Brasília)

SIMONE PERECMANIS (Universidade de Brasília)

CANDICE BERGMANN GARCIA E SILVA TANURE (Universidade de Brasília)

BRASÍLIA/DF, 14 DE JUNHO DE 2016

DEDICO

AOS MEUS PAIS, QUE SEMPRE ESTIVERAM AO MEU LADO.
NÃO EXISTEM PALAVRAS QUE POSSAM DESCREVER MINHA GRATIDÃO E
AMOR.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Denise e Donisete, e meu irmão, Raphael, pois não são todos que crescem em uma família tão amorosa e acolhedora, que sempre me incentivaram a buscar o que eu queria. Em especial à minha mãe, que se não fosse por ela nem teria começado o mestrado.

Ao meu namorado, André Luiz, pelo companheirismo, amor e incentivo.

A minha orientadora Aline e co-orientadora Ângela Patrícia por toda a paciência, ensinamento e dedicação, que sempre estavam dispostas a me ajudar para conseguirmos desenvolver um trabalho gratificante.

Às professoras Candice Tanure e Connie McManus, pela pronta disposição a me ajudar nos problemas com a estatística que tanto me tiraram o sono.

À aluna de doutorado Cristiana Bovi, as de mestrado Thais, Samara e Priscila e aos bolsistas de iniciação científica, Estefany, Oberdan, Érika que sempre estavam a disposição para ajudar nos experimentos e relaxar nos momentos de descontração.

À aluna de mestrado Nara que sempre foi muito prestativa me auxiliando e ensinando.

Às minhas amigas de colégio (Aline, Patrícia, Priscila e Natália), de família (Fernanda, Marina, Olívia e Raphaela) e da graduação (Bruno, Flávia, Letícia, Marina e Priscila) que mesmo não tendo contato a todo o momento ocupam papel importante na minha vida.

A Bonasa por gentilmente ceder as amostras de peito de frango e à Centro Flora por ceder o extrato de erva-mate, possibilitando desta forma, a execução desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais (PPGCA) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UnB), pela oportunidade, colaboração e apoio.

Ao financiamento fornecido pelo CAPES/CNPq, o qual possibilitou a execução deste projeto.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

ÍNDICE

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
CAPÍTULO 1	1
Oxidação lipídica e microbiologia de alimentos	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Problemática e Relevância.....	2
1.2. Objetivos.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Lipídios.....	3
2.2. Auto-oxidação Lipídica	6
2.3. Antioxidantes	11
2.4. Microbiologia.....	15
2.4.1. Fatores que influenciam o crescimento microbiano em alimentos	16
2.4.2. Microbiologia em carnes e produtos cárneos	17
2.4.3. Antimicrobianos naturais.....	19
2.4.4. Bactérias gram-negativas.....	21
2.4.4.1. <i>Escherichia coli</i>	22
2.4.4.2. <i>Proteus mirabilis</i>	22
2.5. Antioxidantes e antimicrobianos naturais.....	23
2.5.1. Erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil).....	24
2.5.1.1. Atividade Antioxidante.....	27
2.5.1.2. Atividade Antimicrobiana.....	28
CAPÍTULO 2	31
Atividade antioxidante do extrato de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil) adicionado em almôndegas carne de peito de frango	31
1. RESUMO.....	31
2. ABSTRACT.....	33
3. INTRODUÇÃO	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37

4.1.	Amostras de carne e do extrato	37
4.2.	Conteúdo de fenólicos totais do extrato	38
4.3.	Composição bromatológica da carne	38
4.4.	Ensaio acelerado de oxidação lipídica.....	38
4.5.	Análise Estatística	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.	CONCLUSÃO	48
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
CAPÍTULO 3		53
Atividade antimicrobiana do extrato de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil) na microbiota da carne de peito de frango resfriada		53
1.	RESUMO.....	53
2.	ABSTRACT.....	55
3.	INTRODUÇÃO	57
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
4.1.	Avaliação microbiológica do extrato de erva-mate	59
4.2.	Coleta da carne do peito de frango e preparo das amostras.....	59
4.3.	Contagem de bactérias mesofílicas totais	60
4.4.	Contagem de bactérias psicotróficas	61
4.5.	Contagem de bolores e leveduras.....	61
4.6.	Pesquisa de <i>Staphylococcus sp.</i>	62
4.7.	Pesquisa de <i>Salmonella sp.</i>	62
4.8.	Número mais provável de coliformes totais e termotolerantes.....	63
4.9.	Isolamento microbiano da carne de peito de frango	63
4.9.1.	Testes bioquímicos utilizados para identificação bacteriana.....	64
4.9.2.	Teste sorológico	64
4.10.	Preparação dos discos com as diferentes concentração de erva-mate e do Inóculo 64	
4.11.	Teste de difusão em disco	65
4.12.	Análises estatísticas	66
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1.	Avaliação microbiológica do extrato de erva-mate e da condição microbiológica da carne no dia 1	67
5.2.	Contagens de bactérias e fungos nos peitos de frango durante o armazenamento	68

5.3. Teste de difusão em disco.....	75
6. CONCLUSÃO	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
CAPÍTULO 4	82
1. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXO 1	92
ANEXO 2.....	93

RESUMO

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil) EM CARNE DE PEITO DE FRANGO

ALUNO: Débora Euclides Mariano da Costa ¹
ORIENTADOR: Dr^a. Aline Mondini Calil Racanicci¹
1 – Universidade de Brasília - UNB

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito antioxidante e antimicrobiano da adição de extrato liofilizado de erva-mate em carnes de peito de frango, para aumentar o tempo de prateleira. Os peitos de frango frescos foram divididos em cinco tratamentos: controle negativo- sem extrato (CN), 0,05% (0,05EM), 0,10% (0,1EM), 0,15% (0,15EM) e 0,20% (0,2EM) de extrato de erva-mate. Para avaliação da atividade antioxidante foi analisado periodicamente o acúmulo dos compostos secundários da oxidação lipídica através do método de TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) nos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10 em almôndegas cozidas e armazenadas a 4°C. No estudo da atividade antimicrobiana foram realizadas contagens de bactérias mesofílicas totais, psicotróficas e bolores e leveduras a cada dois dias (dia 1, 3, 5 e 7) na carne de peito de frango crua armazenada a 7°C. Ainda foi realizado o teste de difusão em disco frente a *E. coli* e ao *P. mirabilis* previamente isolados da carne de frango, utilizando diferentes concentrações do extrato (125mg/ml, 250mg/ml, 550mg/ml, controle negativo (solução salina 0,85%) e erva-mate pura). A adição de 0.10%; 0.15% e 0.20% do extrato de erva-mate foi eficiente na proteção dos lipídios durante o cozimento, uma vez que não houve diferença significativa ($P > 0.05$) nos valores de TBARS entre as almôndegas cruas e cozidas. A adição do extrato de erva-mate reduziu ($P < 0.0001$) a produção de compostos secundários da oxidação lipídica, agindo como um antioxidante natural em almôndegas pré-cozidas durante 10 dias de armazenamento refrigerado, independente da concentração utilizada, quando comparado com o CN. Foi observada uma

regressão quadrática ($P < 0,0001$) entre os tratamentos, indicando que os valores de TBARS diminuíram à medida que a concentração de extrato aumentou, sendo possível estimar a concentração de 0,18% como a mais eficiente no controle da oxidação nas condições do estudo. A contagem de bactérias mesofílicas e psicotróficas foi reduzida ($P < 0,05$) com o aumento da inclusão do extrato somente no primeiro dia de armazenamento. Para bolores e leveduras, a contagem foi reduzida linearmente ($P < 0,05$) quando armazenado por um dia e de forma quadrática ($P < 0,05$) no terceiro dia a medida que a inclusão do extrato aumentou. A aplicação dos tratamentos no teste de difusão em disco apresentou regressão de segundo grau ($P < 0,0001$) tanto para a *E. coli* quanto para o *P. mirabilis*, sendo que quanto maior a concentração de mate, maior o halo de inibição formado, sendo que o tratamento com o mate puro foi o mais eficiente contra ambas as bactérias. Em conclusão, a adição do extrato de erva mate mostrou efeito antimicrobiano *in vitro* frente às bactérias avaliadas, porém quando adicionado diretamente nas amostras de carne de peito de frango não exerceu controle do crescimento microbiano durante os 7 dias de armazenamento resfriado, não contribuindo para a extensão do tempo de prateleira.

Palavras-Chave: Antioxidante natural, antimicrobiano natural, *Escherichia coli*, erva-mate, peito de frango, *Proteus mirabilis*, TBARS.

ABSTRACT

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF YERBA MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil) IN CHICKEN BREAST MEAT

MASTER STUDENT: Débora Euclides Mariano da Costa¹

SUPERVISOR: PhD Aline Mondini Calil Racanicci¹

1 – Universidade de Brasília - UNB

The objective of this study was to investigate the antioxidant and antimicrobial effects of the addition of yerba mate extract on chicken breast meat to increase the shelf life. Fresh chicken breast meat was divided into five treatment: negative control with no extract (NC), 0.05% (0,05EM), 0.10% (0,1EM), 0,15% (0,15EM) and 0.20% (0,2EM) of yerba mate extract. In order to evaluate the antioxidant effect, TBARS method (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) was applied in pre-cooked meatballs to measure the accumulation of secondary lipid oxidation compounds during cooking on days 0, 2, 4, 6, 8 and 10 of chilled storage (4 °C). The antimicrobial activity was evaluated in raw chicken meat stored at 7 °C by counting the amount of total mesophilic bacteria, psychrotrophic bacteria, molds and yeasts every two days (days 1, 3, 5 and 7). *E. coli* and *P. mirabilis* isolated from the chicken meat was used to perform a disc diffusion test using different extract concentrations (125mg/ml, 250mg/ml, 550mg/ml, negative control (solution saline 0.85%) and pure yerba mate). The addition of 0.10%; 0.15% and 0.20% yerba mate extract effectively protected lipids during cooking, since no differences ($P > 0.05$) were found in TBARS values between raw and cooked samples. The addition of yerba mate extract to chicken meatballs reduced ($P < 0.0001$) the production of secondary lipid oxidation compounds acting as a natural antioxidant in pre-cooked meatballs during 10 days of chilled storage regardless the concentration used, when compared to NC. It was observed a quadratic regression ($P < 0.0001$) in which TBARS values reduced as the

addition of yerba mate increased and it was possible to estimate that 0,18% of yerba mate was the most effective concentration to control lipid oxidation in this study. The total mesophilic and psychrotrophic bacteria count was statistically reduced ($P < 0.05$) as the addition of yerba mate increased only on day 1. For molds and yeasts, increasing yerba mate addition reduced linearly ($P < 0,05$) the count on day 1 and quadratically ($P < 0,05$) on day 3. Increasing addition of yerba mate extract also increased ($P < 0,0001$) inhibition for *E. coli* and *P. mirabilis* and the treatment with pure yerba mate showed the most effective treatment against both bacteria. The yerba mate extract showed *in vitro* antimicrobial activity against the studied bacteria, however, did not exhibited microbial growth control when added to raw chicken breast meat during 7 days of chilled storage, not contributing to the extent of shelf life.

Keywords: Natural antioxidant, natural antimicrobial, *Escherichia coli*, yerba mate, chicken breast, *Proteus mirabilis*, TBARS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo do mosaico fluido para a estrutura da membrana (Nelson & Cox, 2006)....	4
Figura 2 - Glicerofosfolípídio a) Fórmula molecular b) Modelo de volume atômico (Voet et al., 2008).....	5
Figura 3 - Estrutura do colesterol (O'Keefe, 2002).....	6
Figura 4 - Mecanismo de auto-oxidação lipídica (Ramalho & Jorge, 2006).	7
Figura 5 - Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando um composto colorido, medido espectrofotometricamente a 532nm (Osawa et al., 2005).	11
Figura 6 - Estrutura básica dos seis subgrupos de flavonóides. Anéis aromáticos (A e B) e anel heterocíclico (C) (Dai & Mumper, 2010).	13
Figura 7 - Estrutura dos ácidos fenólicos importantes de ocorrência natural (Saxena et al., 2012).	14
Figura 8 - Antioxidantes sintéticos mais populares (Gulçin, 2012).	15
Figura 9 - (A) Árvore de Erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil), (B)- folhas e flores da <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil (Lorenzi& Matos; 2008).	24
Figura 10- Construção das curvas de regressão para as concentrações de TBARS (umol MDA Kg-1 de carne)de acordo com as diferentes concentrações do extrato EM durante o armazenamento refrigerado.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplo de fontes naturais e seus respectivos espectros de ação.	20
Tabela 2 - Compostos secundários da oxidação lipídica ($\mu\text{mol MDA/kg}$ de carne) em almôndegas de carne do peito de frango cruas e cozidas sem refrigeração	42
Tabela 3 - Compostos secundários da oxidação lipídica ($\mu\text{mol MDA/kg}$ de carne) em almôndegas de carne do peito de frango adicionadas de diferentes concentrações de extrato de erva-mate durante o armazenamento refrigerado	44
Tabela 4- Resultados médios de NMP de coliformes(NMP/g de amostra) em peito de frango contendo os diferentes tratamentos analisados no dia 1.....	68
Tabela 5 - Contagem de bactérias mesofílicas totais (UFC/g) em peitos de frango adicionados de diferentes concentrações de extrato de EM durante o armazenamento refrigerado.....	69
Tabela 6 - Contagem de bactérias psicotróficas (UFC/g) em peitos de frango adicionados de diferentes concentrações de EM durante o armazenamento resfriado.....	71
Tabela 7 - Contagem de bolores e leveduras (UFC/g) em peitos de frango adicionados de diferentes concentrações de EM durante o armazenamento resfriado.....	73
Tabela 8– Resultados médios da atividade antimicrobiana das diferentes concentrações de extrato de EM frente à <i>E. coli</i> e ao <i>P. mirabilis</i>	75

CAPÍTULO 1

Oxidação lipídica e microbiologia de alimentos

1. INTRODUÇÃO

A carne de aves vem assumindo papel de extrema importância na alimentação humana, principalmente por ser um produto considerado saudável e de baixo custo (Penteado & Esmerino, 2011). Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2014, o Brasil exportou 4.099 milhões de toneladas de carne de frango, um aumento de 5,31% em relação ao ano anterior. O país tem como maiores compradores: a Arábia Saudita e o Japão. A perspectiva da Confederação Nacional de Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) para o ano de 2016 é positiva, estimando um crescimento da produção brasileira de 3 a 4%.

O crescimento microbiano e a oxidação lipídica são os fatores primários da deterioração das carnes durante o armazenamento sob refrigeração e representam uma das principais causas da redução do tempo de prateleira dos alimentos (Govaris et al., 2005; Soares et al., 2012).

Tendo em vista o grande consumo de carnes e a tendência mundial de aumento de produção e consumo, a qualidade desses produtos é de suma importância, tornando-se alvo da preocupação dos órgãos de saúde pública, das indústrias alimentícias e cada vez mais dos consumidores (Rall et al., 2009).

Diversas técnicas são desenvolvidas no intuito de aumentar a qualidade desses produtos e o tempo de prateleira, tais como a embalagem a vácuo ou com atmosfera controlada, a utilização de radiação, o uso de baixas temperaturas e a adição de antioxidantes e antimicrobianos sintéticos ou naturais diretamente na carne ou na dieta do animal (Spoto et al., 1999; Pokorný, 2001; Govaris et al., 2005; Milani et al., 2010).

Durante a poda da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), uma quantidade significativa de resíduos são gerados (galhos e cambitos) que não são aproveitados pela indústria e conseqüentemente são abandonados nas lavouras e que poderiam ser utilizados para a produção de extratos para o aproveitamento dos seus compostos bioativos (Girolometto et al., 2009), uma vez que a planta tem se mostrado um ótimo antioxidante e antimicrobiano (Schinella et al., 2000; Asolini et al., 2006; Matsumoto et al., 2009; De Biasi et al., 2009; Bona et al., 2010; Milani et al., 2010; Berté et al., 2011).

1.1. Problemática e Relevância

Devido a grande demanda por carne de frango e uma maior conscientização dos consumidores, tem-se um maior interesse pela conservação desse produto por meio da adição de compostos naturais, com o intuito de preservar as características organolépticas e aumentar o tempo de prateleira. Desta forma, o uso de aditivos naturais na alimentação das aves ou diretamente na carne tem sido constantemente estudado para verificar a possibilidade de substituição dos aditivos sintéticos já utilizados nas indústrias de alimentos.

Uma vez que existe esse interesse pelos produtos naturais, este trabalho teve como enfoque o estudo da atividade antioxidante e antimicrobiana da erva mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) adicionada à carne do peito de frangos.

1.2. Objetivos

Avaliar a capacidade antioxidante e antimicrobiana do extrato de erva-mate, adicionado diretamente sobre a carne de peito de frango e a atividade antimicrobiana *in vitro* frente a *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* isolados da carne.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Lipídios

Os lipídios são substâncias de origem biológica solúveis em solventes orgânicos como o metanol. Existem dois grupos de lipídios importantes nos tecidos, os lipídios de armazenamento, que são os triglicerídeos ou lipídios neutros, sendo a principal classe de lipídios em tecido adiposo (> 90%), e os lipídios de membrana em que se destacam os fosfolipídios, os glicolipídios e os esteróis. No músculo, uma proporção significativa é composta por fosfolipídios, que possuem um teor de ácidos graxos poliinsaturados mais elevados a fim de desempenhar a sua função como componente de membrana celular (Nelson & Cox, 2006; Wood et al., 2008; Voet et al., 2008).

Os ácidos graxos (AG) são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas de comprimento de 4 a 36 carbonos, constituindo uma fonte rica de energia e carbono. Podem ser saturados ou insaturados. Os AGs mais frequentemente encontrados possuem um número par de átomos de carbono em uma cadeia não ramificada de 12 a 24 carbonos. Em quase todos os ácidos graxos insaturados que ocorrem na natureza, as duplas ligações estão na conformação *cis*, o que coloca uma dobra rígida de 30° na cadeia de hidrocarboneto. Quanto mais longa for a cadeia acila do AG e menor o número de duplas ligações, menor é a solubilidade em água. Assim como a solubilidade em água, o ponto de fusão também é influenciado pelo grau de saturação e pelo comprimento da cadeia hidrocarbonada, sendo maior em AG saturados e de cadeia longa (Nelson & Cox, 2006; Mariutti & Bragagnolo, 2009; Voet et al., 2008).

Os triglicerídeos (TG) são compostos por uma molécula de glicerol e três moléculas de ácidos graxos, sendo os TGs que possuem os mesmos AGs chamados de

triglicerídeos simples e os que apresentam dois ou mais AG diferentes chamados de triglicerídeos mistos, estes de maior ocorrência natural. TG são moléculas de baixa densidade, apolares, hidrofóbicas, essencialmente insolúveis em água. Nos animais, os TGs atuam como reserva de energia, sendo a classe de lipídios mais abundante, apesar de não serem componentes de membrana celular. Os adipócitos armazenam grande quantidade de TG na forma de gotículas de gordura, essas células possuem enzimas lipases que fazem a hidrólise do TG armazenados liberando AG como de fonte de energia, uma vez que a oxidação de AG é mais eficiente, pois fornece mais do que o dobro de energia que a oxidação de açúcares (Nelson & Cox, 2006; Voet et al., 2008).

Nos tecidos animais, a membrana celular é composta por lipídios e por proteínas. Esses componentes são mantidos juntos principalmente por interações hidrofóbicas não-covalentes e, por esse motivo, a membrana é muito flexível, permitindo a movimentação dos lipídios e proteínas pela membrana celular, além de alterações na forma e no tamanho das células. As proporções relativas das proteínas e lipídios variam conforme o tipo de membrana e refletem os papéis biológicos de cada uma. Os lipídios encontrados na membrana possuem função estrutural e estão presentes como uma bicamada lipídica, na qual duas monocamadas de lipídios formam uma lâmina bidimensional, conforme o modelo do mosaico fluido (Figura 1). As principais moléculas de lipídios das membranas são os fosfolipídios que possuem uma porção polar (hidrofílica) e uma apolar (hidrofóbica) (Nelson & Cox, 2006).

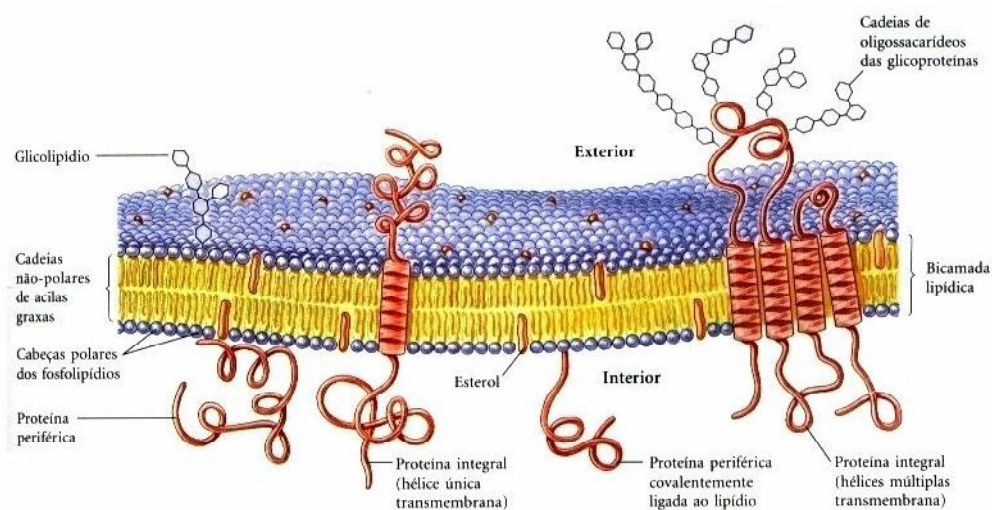


Figura 1 - Modelo do mosaico fluido para a estrutura da membrana (Nelson & Cox, 2006)

Os glicerofosfolípidios (Figura 2) são os principais componentes lipídicos encontrados nas membranas biológicas. São compostos por glicerol, ácidos graxos e mais o grupo fosfato, que está quase sempre ligado na posição C3 da molécula de glicerol. Possuem uma "cabeça" polar que fica voltada para fora da membrana celular e duas caudas apolares voltadas para o interior, sendo que geralmente as caudas são formadas por AGs saturados e insaturados (O'Keefe, 2002; Nelson & Cox, 2006; Voet et al., 2008). As duas lâminas da bicamada lipídica não são equivalentes em composição, sendo que as glicoproteínas e glicolípídios estão voltadas para o exterior da célula (Voet et al., 2008).

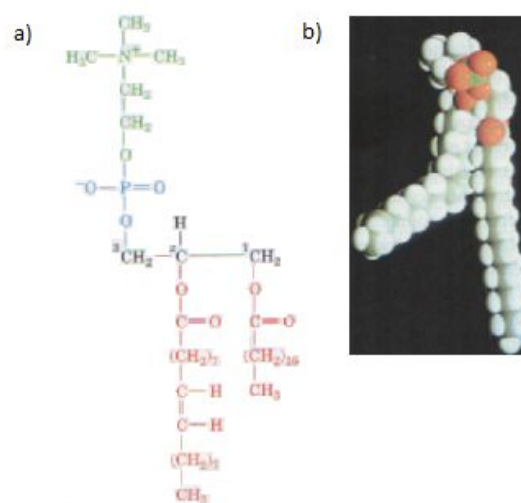


Figura 2 - Glicerofosfolípidio a) Fórmula molecular b) Modelo de volume atômico (Voet et al., 2008)

Outro lipídio amplamente encontrado nas membranas é o colesterol (Figura 3), um esteróide que possui quatro anéis carbônicos fundidos entre si e um grupo hidroxila. Ele possui duas funções importantes: componente estrutural da membrana celular e precursor metabólico dos hormônios esteróides, como o cortisol e a testosterona (Voet et al., 2008). A possibilidade de oxidação do colesterol *in vivo*, levando à formação de óxidos de colesterol é de grande importância uma vez que esses componentes estão associados à arteriosclerose (O'Keefe, 2002).

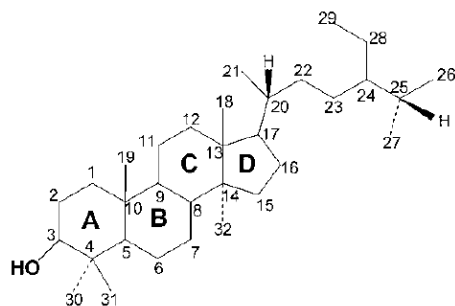


Figura 3 - Estrutura do colesterol (O'Keefe, 2002)

O conteúdo total de gordura do animal e do músculo tem um impacto importante na proporção dos diferentes tipos de ácidos graxos, uma vez que lipídios neutros e de fosfolipídios possuem diferentes composições de ácidos graxos. O fosfolipídio é um componente essencial das membranas celulares e seu valor permanece basicamente constante, ou aumenta pouco à medida que os animais engordam. Mas quando a gordura corporal aumenta, os lipídios neutros, sendo o ácido oléico o principal componente, predominam na composição de ácidos graxos totais (Wood et al., 2008). O teor de ácidos graxos saturados e monoinsaturados aumenta mais rapidamente com o aumento da gordura do que o teor de AGP o que leva a uma redução na proporção relativa de AGP quando ocorre o aumento do conteúdo lipídico nas carnes (De Smet et al., 2004).

Apesar do conteúdo lipídico das carnes não ser popular entre os consumidores, sendo considerado pouco saudável, as gorduras presentes nos tecidos adiposos e nos músculos contribuem para a preservação da qualidade da carne, além de possuírem papel central em relação às suas características nutricionais e organolépticas (Wood et al., 2008).

2.2. Auto-oxidação Lipídica

A auto-oxidação lipídica é uma reação importante, uma vez que limita a vida de prateleira de vários alimentos, pois é um dos mecanismos primários da deterioração da qualidade dos alimentos, especialmente das carnes. Dentre as alterações na qualidade, destacam-se as mudanças sensoriais como o sabor, a cor, a textura e também mudanças no valor nutricional. Alguns dos fatores extrínsecos que contribuem para o desenvolvimento da oxidação lipídica em carnes são as condições de processamento, como a moagem, o tratamento térmico, a aplicação de alta pressão, a adição de outros ingredientes na formulação

do produto, a temperatura de armazenamento, o tipo de embalagem e a exposição à luz (Pokorný, 2001; Govaris et al., 2005; Mariutti & Bragagnolo, 2009). O gosto e o cheiro desagradáveis associados à oxidação lipídica resultam da clivagem oxidativa de duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, produzindo aldeídos e ácidos carboxílicos de cadeia mais curta e, portanto, com maior volatilidade (Nelson & Cox, 2006).

Após o abate, os mecanismos antioxidantes que ocorrem *in vivo* diminuem expressivamente devido as alterações naturais que ocorrem na transformação de músculo em carne, favorecendo a oxidação lipídica (Min & Ahn, 2005). Os lipídios são os componentes alimentares quimicamente mais instáveis e, conseqüentemente, suscetíveis a sofrerem reações oxidativas rapidamente por meios dos seus ácidos graxos poliinsaturados (AGP) na presença de oxigênio e catalisadores (Min & Ahn, 2005). Os AGP apresentam alto potencial de decomposição por meio desse processo, estando presentes como ácidos graxos livres, como triglicerídeos ou como fosfolipídios. É importante ressaltar que a quantidade de lipídios nos alimentos é menos importante do que a natureza e a susceptibilidade destes à oxidação (Adams, 1999; Gordon, 2001).

A auto-oxidação é uma reação de radicais livres, que são espécies químicas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados no seu último orbital, tornando-as altamente reativas (Fogaça & Sant'ana, 2009). A auto-oxidação ocorre em três etapas, a inicialização, a propagação e a terminação (Gordon, 2001), como pode ser visto na Figura 4. As três etapas são caracterizadas pelo desaparecimento de substratos da oxidação (AG e oxigênio), aparecimento de produtos primários da oxidação, como os peróxidos e hidroperóxidos, e, por fim, o aparecimento dos produtos secundários da oxidação, como os aldeídos e álcoois (Wójciak & Dolatowski, 2012).

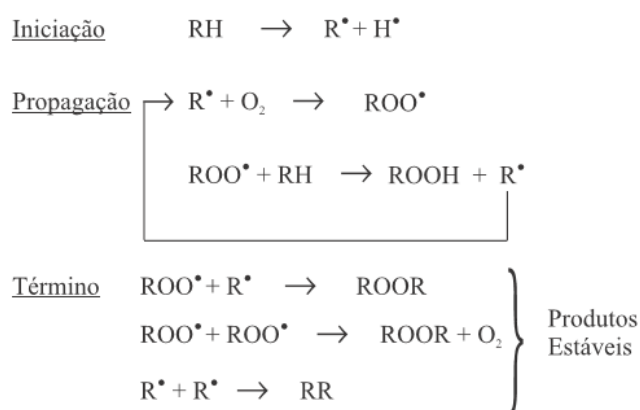


Figura 4 - Mecanismo de auto-oxidação lipídica (Ramalho & Jorge, 2006).

Na inicialização, apesar de não ocorrerem mudanças significativas no sabor e na qualidade da gordura (Adams, 1999), as moléculas lipídicas interagem com espécies reativas, como um radical hidroxil, perdendo um átomo de hidrogênio do grupo metileno formando um radical lipídico. Esta reação é normalmente catalisada por íons metálicos (Gordon, 2001, Min & Ahn, 2005), sendo o cobalto, o cobre, o ferro e o manganês os metais mais importantes nessa fase.

A formação de radicais livres também pode ser influenciada pela ação de enzimas como as lipases e lipoxigenases, da luz, principalmente a radiação ultravioleta, do calor, da umidade e pela presença de oxigênio. Porém, o oxigênio possui pouca participação na fase de iniciação da auto-oxidação, sendo mais importante na fase de propagação (Adams, 1999).

Teoricamente, a molécula de oxigênio atmosférico não consegue interagir com os AGP, pois o oxigênio no seu estado fundamental não tem reatividade suficiente para fazer esta reação. No entanto, o oxigênio pode ser reduzido a produtos de vida curta e altamente reativos denominados de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2^-), radical hidroperóxido (HO_2^-), radical peróxido lipídico ($\text{LOO}\cdot$), radical alcoxi ($\text{LO}\cdot$), complexo ferro-oxigênio e oxigênio “singlet” ($^1\text{O}_2$) (Min & Ahn, 2005).

Após a etapa de inicialização, ocorrem as reações de propagação, nas quais um radical lipídico sofre rearranjo molecular e forma um dieno conjugado que em condições de aerobiose, reage com o oxigênio formando um radical peróxido. Os peróxidos formados retiram um hidrogênio de outra molécula lipídica para formar um hidroperóxido lipídico com consequente formação de um novo radical livre e propagando a reação em cadeia (Gordon, 2001). Já em ambientes com baixos níveis de oxigênio, os dienos conjugados podem interagir entre si dentro da membrana ou com as proteínas e colesterol de membrana (Frank et al., 1989). A decomposição de hidroperóxidos, que leva a formação de compostos secundários da oxidação, também é catalisada por metais pesados (Pokorný, 2001).

A entalpia da reação de propagação é relativamente baixa, quando comparada com a inicialização, ou seja, as reações de propagação ocorrem mais rapidamente. A perda do hidrogênio pela molécula lipídica geralmente ocorre no grupo metileno, que está próximo de grupos alquenos em um AGP, uma vez que a energia de dissociação da ligação entre o carbono e o hidrogênio é baixa devido à sua proximidade com o grupo alqueno (Gordon,

2001). Estes mecanismos de propagação podem ocorrer até 100 vezes antes de dois radicais lipídicos se combinarem e terminarem o processo (Estévez, 2015).

Por fim inicia-se a fase de terminação, em que os radicais peróxidos se juntam entre si e formam moléculas estáveis com uma gama completa de elétrons, os chamados compostos secundários da oxidação lipídica. Os compostos secundários encontrados incluem produtos voláteis e não voláteis como os hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos. Essas substâncias têm a capacidade de diminuir a oxidação, porém geram características indesejáveis como impalatabilidade, odor e sabor de ranço, causando rejeição desses produtos pelos consumidores, sendo os aldeídos os grandes contribuintes para as alterações sensoriais (Adams, 1999; Gordon, 2001).

Existem vários lipídios nos alimentos que espontaneamente podem reagir com o oxigênio atmosférico e deteriorarem-se devido a auto-oxidação, como gorduras e óleos, esteróides, vitaminas lipossolúveis como a A, D, E e K, e pigmentos carotenóides. Lipídios oxidados em geral perdem suas características nutricionais e podem se tornar impalatáveis, as vitaminas perdem sua atividade biológica e os pigmentos perdem as suas cores características (Adams, 1999).

A auto-oxidação é um perigo real e constante para os alimentos e pode ocorrer em todos os estágios, desde o produto cru até o processamento, armazenamento, distribuição e na preparação final. Por isso, o controle da auto-oxidação é de vital importância para o armazenamento e, conseqüentemente, para um maior tempo de prateleira dos produtos (Adams, 1999).

A carne de frango é um alimento altamente susceptível à oxidação lipídica por conter em sua composição um elevado teor de ácidos graxos insaturados (Mariutti & Bragagnolo, 2009) e baixos níveis de antioxidantes naturais, como os tocoferóis (Melton, 1983). O teor de lipídios totais em cortes de peito de frango cru e sem pele é de aproximadamente 3%, sendo constituído por 1,1% de AG saturados, 1,3% AG monoinsaturados e traços de AGP (NEPA, 2011). Esses valores diferem um pouco dos encontrados por Cantor et al., (2008) em que o teor de lipídios totais em cortes de peito de frango sem pele foi de aproximadamente 1,7%, sendo constituído por 36,6% de AG saturados, 32,5% AG monoinsaturados e 30,8% AGP. Essas variações podem estar relacionadas a fatores relativos à produção animal como nutrição, genética e sexo das aves (Novello et al., 2008, Faria et al., 2009).

Além da quantidade de AGP, existem diversos outros fatores envolvidos na peroxidação lipídica, tais como a presença ou não de enzimas antioxidantes e metais pesados

como o ferro, a ocorrência de estresses pré-abate por calor, as condições de armazenamento e os processamentos industriais como cozimento, desossa e incorporação de aditivos (Min & Ahn, 2005).

Os fosfolípidios nos músculos apresentam maior grau de insaturação que os triglicerídeos, que são compostos principalmente por ácidos graxos saturados ou monoinsaturados, conseqüentemente apresentam importante papel no processo de oxidação lipídica contribuindo muito com a formação de malonaldeídos (MDA) (De Smet et al., 2004; Lima Junior et al., 2013). Esses lipídios são os principais precursores dos produtos da oxidação lipídica, formando aproximadamente 90% dos MDA (Ventanas et al., 2007; Pikul et al. 1984)

É necessário armazenar as carnes cruas ou após a cocção em temperaturas baixas para minimizar a ocorrência da oxidação lipídica, pois quanto mais alta for a temperatura, maior será a oxidação (Adams, 1999), uma vez que a refrigeração diminui a atividade molecular reduzindo as interações entre moléculas pró-oxidantes e os lipídios (Limbo et al., 2010). Porém, submeter carnes à baixas temperaturas não necessariamente irá impedir a ocorrência da auto-oxidação, ela apenas poderá ser retardada (Adams, 1999).

Existem diferentes formas de se avaliar o estado oxidativo dos lipídios em alimentos. A determinação das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) é a metodologia mais utilizada em carnes e derivados, que se baseia na quantificação principalmente de malonaldeído (MDA) a partir da reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (Figura 5), produzindo um composto de cor vermelha medido espectrofotometricamente a 532 nm de comprimento de onda. O malonaldeído é um dialdeído com três carbonos, possuindo grupos carbonilas nos carbonos C-1 e C-3. É um dos principais produtos da decomposição dos hidroperóxidos dos AGP produzidos durante a oxidação lipídica (Nair & Turner, 1984; Lima Junior et al., 2013). Embora seja uma avaliação indireta da oxidação, essa metodologia é muito útil na comparação de um único material em diferentes estágios de oxidação (Osawa et al., 2005).

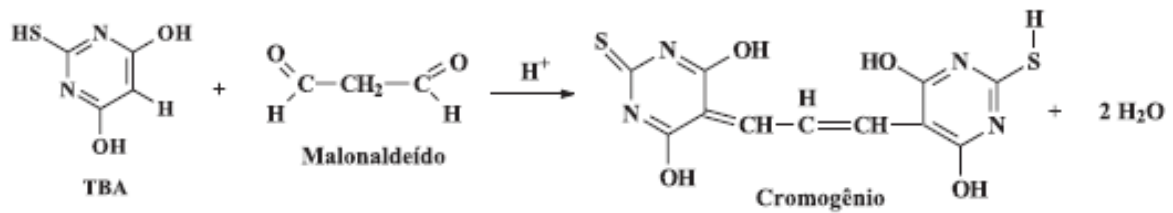


Figura 5 - Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando um composto colorido, medido espectrofotometricamente a 532nm (Osawa et al., 2005).

Devido a alta correlação entre a ingestão de compostos oxidados e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e de outras doenças crônicas não transmissíveis, o consumo de lipídios, principalmente de lipídios oxidados, tem sido alvo de intensa investigação pela área da saúde (Mariutti & Bragagnolo, 2009), tornando-se inevitável a utilização de estratégias para controlar esse processo (Estévez, 2015).

A oxidação lipídica pode ser inibida por vários métodos como a prevenção do acesso de oxigênio, o uso de baixas temperaturas, inativação de enzimas que catalisam a oxidação, redução da pressão de oxigênio, o uso de embalagens adequadas e a adição de antioxidantes (Pokorný, 2001).

2.3. Antioxidantes

Os antioxidantes são uma classe de substâncias que possuem varias estruturas químicas e diferentes mecanismos de ação. Para o uso em alimentos, devem ser compatíveis com o substrato, não conferir odor ou sabor estranho ao produto, serem efetivos durante o período de armazenamento do produto alimentício e serem estáveis ao processo de aquecimento (Melo & Guerra, 2002).

O mecanismo de ação mais importante é a reação com radicais livres, no qual essas moléculas atuam como doadoras de elétrons fazendo a estabilização desses radicais livres (Lima Junior et al., 2013) e formando produtos inativos e, conseqüentemente, desacelerando o processo de oxidação (Pokorný, 2001). Deste modo, os antioxidantes retardam o desenvolvimento da rancidez oxidativa e de *off-flavours*, aumentando o período de indução da oxidação lipídica. Porém, é importante ressaltar que a adição de antioxidantes após

o término do período de iniciação é ineficaz no retardo do desenvolvimento de rancidez (Gordon, 2001).

Os antioxidantes podem ser divididos em antioxidantes primários, como os compostos fenólicos que inativam os radicais livres; estabilizadores de hidroperóxidos, que previnem a decomposição dos hidroperóxidos e consequente formação de radicais livres; em compostos sinérgicos, que promovem as atividades dos antioxidantes primários; quelantes de metais, que se ligam a metais pesados formando compostos inativos; em quelantes de oxigênio “singlet”, que transformam essa molécula em oxigênio triplet e em substâncias redutoras hidroperóxidos, que reduzem os hidroperóxidos sem formar radicais (Pokorný, 2001).

Os antioxidantes ainda podem ser divididos em naturais ou sintéticos (Pokorný, 2001) e ainda em enzimáticos e não enzimáticos. Os enzimáticos atuam impedindo a formação ou sequestrando as espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo composto pela catalase, pelo superóxido dismutase e pela glutathione peroxidase. Já os antioxidantes não enzimáticos são encontrados principalmente em frutas e vegetais (Colpo, 2012).

A maior parte dos antioxidantes naturais são compostos fenólicos, havendo três grupos principais: os tocoferóis, os flavonóides e os ácidos fenólicos (Yanishlieva-Maslarova, 2001).

A vitamina E, que é um nome coletivo para os tocoferóis, são moléculas hidrofóbicas que possuem um anel aromático, associam-se com a membrana celular, depósitos lipídicos e lipoproteínas no sangue. É um antioxidante biológico primário, pois o seu anel aromático reage com as formas reativas dos radicais de oxigênio e outros radicais livres e os inativa, protegendo da oxidação os AG insaturados e os lipídios da membrana, impedindo assim os danos oxidativos (Nelson & Cox, 2006). O mecanismo de ação dos tocoferóis se baseia na doação de um hidrogênio de seu grupo hidroxila para o radical peróxido do lipídio. Além disso, eles também são associados ao retardo da decomposição de hidroperóxidos (Frankel, 1996).

Os compostos fenólicos possuem um ou mais anéis aromáticos, sendo os metabólitos secundários mais abundantes em plantas e são responsáveis pelas propriedades organolépticas globais dessas plantas. Uma vez que estão presentes em várias plantas (frutas, vegetais, cereais, legumes etc) e bebidas (chás, café, cerveja, vinhos etc), usualmente fazem parte da dieta humana (Dai & Mumper, 2010).

Os compostos fenólicos agem como antioxidantes primários inativando os radicais livres e estabilizando os hidroperóxidos, prevenindo sua decomposição e,

consequentemente, a formação de radicais livres (Pokorný, 2001). Como uma propriedade antioxidante alternativa, alguns compostos fenólicos com grupos dihidroxi podem conjugar metais de transição, evitando a formação de radicais livres induzida por metais. (Dai & Mumper, 2010). Segundo Rice-Evans et al.(1995) os compostos fenólicos geralmente são mais eficazes que as vitaminas C, vitaminas E e os carotenóides.

Os flavonóides são uma subclasse de polifenólicos, compostos geralmente por dois anéis aromáticos cada um contendo pelo menos um grupo hidroxila, que estão ligados a um anel heterocíclico (Beecher, 2003). São divididos em seis subgrupos: flavonas, flavonóis, flavonóides, flavanonas, isoflavonas e antocianinas (Dai & Mumper, 2010) (Figura 6). Os flavonóides são amplamente distribuídos na natureza, embora não uniformemente. Estão presentes em grande quantidade em chás, frutas como maçã e mirtilo, tofu, chocolate amargo e vinhos tintos (Beecher, 2003). A atividade antioxidante apresentada pelos flavonóides se dá pela eliminação de radicais livres e dos ROS. Além da ação antioxidante, tem sido relatados efeitos antimicrobianos, antiinflamatórios e antitumorais (Saxena et al., 2012).

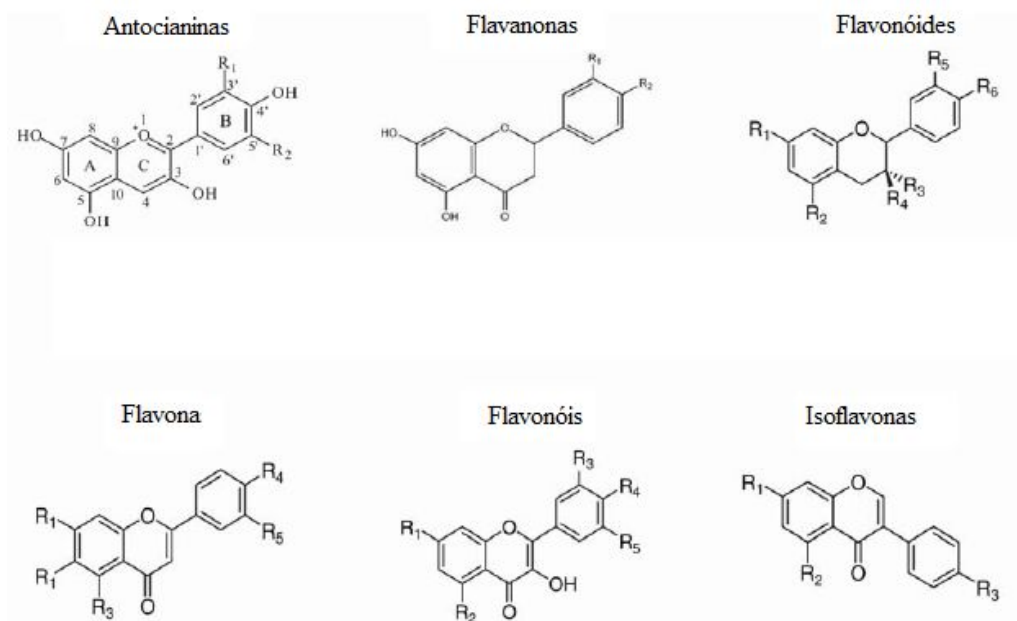


Figura 6 - Estrutura básica dos seis subgrupos de flavonóides. Anéis aromáticos (A e B) e anel heterocíclico (C) (Dai & Mumper, 2010).

Os ácidos fenólicos são fenóis que geralmente possuem em sua estrutura um ácido carboxílico. São considerados polifenóis, pois são bioprecursores e metabólitos de polifenóis. Possuem dois grupos de diferentes estruturas: o grupo dos ácidos hidroxicinâmico

que possuem como componentes os ácidos benzóicos, gálico, salicílico entre outros, e o grupo dos ácidos hidroxibenzoicos que possuem os ácidos cinâmico, ferrúlico, caféico, entre outros (Figura 7). São considerados antioxidantes eficazes, uma vez que possuem a capacidade de eliminar radicais livres, desacelerando o processo de oxidação e conseqüente dano oxidativo (Saxena et al., 2012).

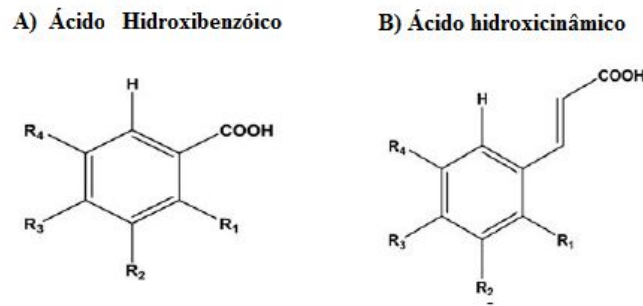


Figura 7 - Estrutura dos ácidos fenólicos importantes de ocorrência natural (Saxena et al., 2012).

Os antioxidantes sintéticos mais populares são compostos fenólicos como o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG) (Figura 8), relativamente estáveis ao calor e por isso muito utilizados na indústria para a conservação de produtos que passam por processamentos envolvendo o calor. Quando utilizados em conjunto, alguns antioxidantes sintéticos como o BHA com BHT e o BHA com o PG, apresentam sinergismo, conforme relatado na literatura (Yanishlieva-Maslarova, 2001; Gulçin, 2012).

Atualmente, o uso de antioxidantes sintéticos na indústria de produtos alimentícios, incluindo as carnes, é uma prática comum que visa aumentar o tempo de prateleira desses produtos. Porém, cada vez mais há um aumento da demanda por produtos naturais, devido à crescente preocupação com a saúde (Mariutti & Bragagnolo, 2009) e também devido a existência de limites estritos de inserção dos antioxidantes sintéticos nos alimentos (Laguerre et al., 2007). No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa 51, de 29 de dezembro de 2006, instituiu o regulamento técnico de atribuição de aditivos e seus limites em produtos cárneos, estabelecendo os limites máximos de adição de BHT, BHA e PG em 0,01%. Além desses antioxidantes sintéticos, outros conservantes sintéticos são amplamente utilizados nas

indústrias de produtos cárneos como os nitritos e nitratos, que possuem limites máximos de 0,015 e 0,03% respectivamente segundo a mesma instrução normativa.

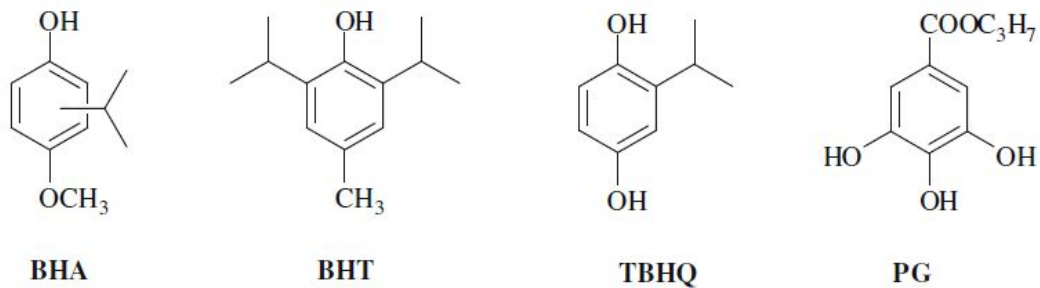


Figura 8 - Antioxidantes sintéticos mais populares (Gulçin, 2012).

Existem diferentes formas de adicionar antioxidantes em carnes visando reduzir a ocorrência de danos oxidativos e a perda de qualidade sensorial desses alimentos. Antioxidantes podem ser adicionados na dieta dos animais (Govaris et al., 2005), diretamente na carne (Racanicci et al., 2008) ou ainda, por meio do uso de filmes de cobertura adicionados de antioxidantes (Zhou et al., 2010). Ressalta-se que o uso de antioxidantes nos alimentos deve ser compatível com o substrato sem adicionar odor ou sabor que sejam estranhos aos produtos (Melo & Guerra, 2002).

2.4. Microbiologia

Durante a divisão celular das bactérias, uma célula transforma-se em duas levando a um crescimento exponencial da população. O tempo necessário para que esse processo ocorra é chamado de tempo de geração e é bem variável entre os diversos microrganismos. As bactérias apresentam tempos de geração geralmente inferiores aos

eucariotos microbianos, sendo geralmente entre 0,5 a 6 horas nas melhores condições de crescimento (Madigan et al., 2010).

O ciclo de crescimento de populações microbianas é dividido em quatro fases principais: Lag, exponencial (Log), estacionária e morte. A fase Lag é caracterizada pela adaptação das bactérias ao meio. Na fase Log, as bactérias estão se multiplicando e a população duplicando de tempos em tempos até chegar na fase estacionária, em que a taxa de crescimento é igual a de morte. Nessa fase, ocorre a morte dos microrganismos devido à escassez de nutrientes essenciais, acúmulo de produtos finais tóxicos e mudanças no ambiente, tais como a variação do pH. Por fim, ocorre a fase de morte, em que o número de agentes morrendo é superior a sua multiplicação (Forsythe, 2002; Quinn et al., 2005; Madigan et al., 2010).

2.4.1. Fatores que influenciam o crescimento microbiano em alimentos

Grande parte dos alimentos possui quantidade suficiente de nutrientes para garantir o crescimento microbiano, porém diversas condições influenciam este crescimento, como os fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores intrínsecos destacam-se: a atividade de água, a disponibilidade de nutrientes, o pH, o potencial de oxi-redução e a presença de substâncias naturalmente antimicrobianas. Já dentre os fatores extrínsecos, a temperatura, a umidade relativa do ar, a composição atmosférica e a embalagem são os de maior relevância (Forsythe, 2002).

A disponibilidade de água em um meio é expressa como atividade de água. A maioria dos microrganismos não consegue se desenvolver em ambientes com baixa atividade de água, morrendo ou sofrendo desidratação (Madigan et al., 2010).

A temperatura é provavelmente o fator ambiental mais importante que afeta o crescimento e sobrevivência das bactérias. Todo microrganismo possui uma temperatura ótima de crescimento, sendo que essa faixa de temperatura varia de 25 a 40°C. Os microrganismos são divididos em grupos conforme as temperaturas ótimas para o crescimento (Madigan et al., 2010). As bactérias psicotróficas possuem temperatura ótima entre 12 e 15°C, sobrevivendo em no mínimo -5°C e no máximo 20°C. As bactérias mesofílicas já apresentam melhor crescimento entre 30 e 45 °C, resistindo a no mínimo 5°C e no máximo 47°C. Já os

termófilos tem como temperatura ótima entre 55 e 75°C, sobrevivendo no mínimo a 40°C e no máximo a 60-90°C (Forsythe, 2002). Segundo Madigan et al. (2010), a temperatura ótima situa-se sempre mais próxima da temperatura máxima do que da mínima.

Assim como a temperatura, os microrganismos possuem faixas de pH ideais para seu desenvolvimento, que variam de 2 a 3 unidades e um pH ótimo (Madigan et al., 2010). A maioria das bactérias possuem melhores taxas de crescimento em pH neutro e, por essa razão, grande parte dos meios de cultura para cultivo de bactérias são tamponados em pH em torno de 7 (Quinn et al., 2005).

Com relação à aceitação aos diferentes níveis de oxigênio, as bactérias podem ser divididas em aeróbias, aeróbias facultativas, anaeróbias obrigatórias, anaeróbias aerotolerantes e microaerófilas (Quinn et al., 2005; Madigan et al., 2010).

O potencial de oxi-redução determina quais classes de micro-organismos poderão se desenvolver nos alimentos. Os micro-organismos aeróbicos precisam de potencial de oxi-redução de +200mV para se desenvolver, já os anaeróbios precisam de -200mV e os microaerófilos necessitam de potencial próximo de zero. Quanto mais oxidada estiver uma substância, mais positivo será seu potencial elétrico e, quanto mais reduzida, mais negativo será o potencial (Baruffaldi & Oliveira, 1998).

2.4.2. Microbiologia em carnes e produtos cárneos

A carne é um alimento altamente perecível, uma vez que possui atividade de água entre 0,95 e 1,0 e baixa acidez (pH 5,4 a 7), favorecendo o crescimento microbiano. O tempo de prateleira da carne refrigerada em aerobiose é considerado curto e depende principalmente da taxa bacteriana inicial. A carne é considerada um produto estéril inicialmente, porém, pode ser facilmente contaminado durante o abate e evisceração e pela manipulação e armazenagem inadequada (Forsythe, 2002; Milani, 2012). Além disso, alguns pontos críticos na contaminação de carnes de aves são: o tanque de escalda, as depenadeiras, o tanque de resfriamento, onde podem ocorrer contaminações das carcaças (Cardoso, 2008).

Existe um grande número de fatores que contribuem para tornar os alimentos inseguros, causadores de toxinfecções em humanos e animais, tais como: controle inadequado da temperatura de cozimento ou resfriamento, higiene pessoal insuficiente, contaminação

cruzada e o monitoramento inadequado dos processos. Esses fatores podem ser reduzidos significativamente por meio de treinamento adequado dos manipuladores e da aplicação do sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) e de uma adequada avaliação de risco (Forsythe, 2002).

Os patógenos de origem alimentar mais comuns são as bactérias capazes de crescer em temperaturas em torno de 37°C, nesse grupo se destaca a *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* (Forsythe, 2002). Além dos microrganismos patogênicos que podem ser encontrados em alimentos causando intoxicações ou toxinfecções, existem os microrganismos deteriorantes, que são agentes que degradam os alimentos produzindo compostos voláteis que levam a formação de sabor e odor desagradáveis, porém sem causar toxinfecções, sendo importantes na qualidade e não na segurança alimentar (Forsythe, 2002).

A contagem de bactérias mesofílicas totais é um indicador da qualidade sanitária dos alimentos. Contagens elevadas indicam matéria-prima contaminada ou processamentos inadequados. Já a pesquisa de coliformes termotolerantes é um indicativo de contaminação fecal, uma vez que 90% das células microbianas que pertencem a esse grupo são de *E. coli*, que possui como habitat primário apenas o intestino (Carvalho, 2010).

Existe uma diversidade de bactérias que provocam a deterioração de produtos cárneos. As *Pseudomonas* spp. e as *Aeromonas* spp. são bactérias gram-negativas que levam a deterioração das carnes durante a refrigeração, já as bactérias ácido-lácticas, bastonetes gram-positivas, causam deterioração em carnes embaladas em atmosfera modificada ou a vácuo. Os microrganismos formadores de esporos como *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. são importantes em alimentos processados termicamente, uma vez que seus esporos podem sobreviver ao processamento (Forsythe, 2002). Segundo Jay (2005), também se encontram bolores e leveduras em carnes de aves, sendo as leveduras do gênero *Candida* e *Rhodotorula* as mais detectadas.

Em carnes de frango, as bactérias patogênicas encontradas incluem: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e *Salmonella* spp.. As bactérias deteriorantes encontradas nas carcaças geralmente são provenientes da contaminação durante a evisceração e são, na maior parte dos casos, microrganismos mesófilos tais como a *Escherichia coli*, a *Aeromonas* spp. e o *Proteus* spp., porém em temperaturas de refrigeração abaixo de 5°C a flora deteriorante será predominantemente composta de *Pseudomonas* (Spoto et al., 1999; Forsythe, 2002).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regula os parâmetros microbiológicos em alimentos por meio da resolução RDC nº12, de 12 de janeiro de 2001, que estabelece para carnes resfriadas ou congeladas “in natura” de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes) como único parâmetro microbiológico o número máximo de coliformes termotolerantes, sendo este estipulado em 10^4 NMP/g. O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa 70, de 6 de outubro de 2003, instituiu o programa de redução de patógenos em carnes de frango e perus em abatedouros com SIF, estabelecendo o controle de *Samonella spp.* nas carnes de aves. Segundo essa normativa, é considerado aceitável a presença de *Salmonella spp.* em no máximo 12 carcaças de frango para cada 51 carcaças analisadas.

2.4.3. Antimicrobianos naturais

Nos últimos anos, a atividade antibacteriana de extratos de plantas tem sido objeto de várias pesquisas (Martin, 2011, De Biasi et al., 2009, Bendahou et al., 2008). Partes aéreas de espécies vegetais, como ramos, folhas e flores, e partes subterrâneas, como tubérculos, rizomas e raízes, são frequentemente estudadas na busca por novos compostos (Benkeblia, 2004). O interesse pela utilização de plantas como antimicrobianos naturais se deve ao fato dos consumidores estarem começando a rejeitar o uso de produtos sintéticos e aumentando o interesse pela utilização de produtos naturais, além da preocupação, por parte também do meio científico, com a resistência microbiana causada pela prescrição excessiva e uso indevido de antibióticos tradicionais (Cowan, 1999).

Antimicrobianos naturais que ocorrem em animais, plantas e em microrganismos resultam de um mecanismo evolutivo de defesa do hospedeiro contra invasores e estão presentes em abundância no meio ambiente (Naidu, 2000). Segundo Cowan (1999), as plantas possuem habilidade quase ilimitada de produzir substâncias aromáticas que, em vários casos, atuam como mecanismo de defesa contra microrganismos, insetos e herbívoros.

As propriedades antimicrobianas de substâncias oriundas de plantas têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas foram confirmadas cientificamente apenas recentemente. Vários grupos de pesquisadores estudam a atividade biológica de plantas medicinais e frutíferas originárias de diversas regiões do mundo orientadas pelo seu uso

popular (Guedes, 2013). Entretanto, grande maioria das plantas, normalmente empregadas como fitoterápicos populares, não tiveram suas potencialidades terapêuticas efetivamente comprovadas (Gonçalves et al., 2005).

Já é sabido que os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas extraídos de plantas, os terpenóides e óleos essenciais que atuam principalmente na ruptura de membranas, os alcalóides intercalam-se na parede celular ou no DNA, e as substâncias fenólicas atuam de forma bem ampla, sendo que os fenóis simples e os ácidos fenólicos podem provocar privação de substrato e ruptura de membranas, as flavonas, os flavonóides podem se vincular a proteínas como as adesinas, inibir a função da membrana citoplasmática e inativar enzimas como a DNA girase, os taninos possuem a capacidade de se vincular a adesinas, inibir enzimas, promover a ruptura de membrana e causar a privação de substratos (Kubo et al., 1993; Cowan, 1999; Cushnie & Lamb, 2005; Lorenzi & Matos, 2008; Tajkarimi et al., 2010).

As fontes naturais possuem compostos antimicrobianos com espectros de ação bem variados, sendo que, em várias fontes a atividade antimicrobiana é concomitantemente contra bactérias gram-negativas e positiva e ainda, em muitos casos, são efetivas contra bactérias de alto poder patogênico como a *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphilococcus aureus* (Quadro 1 1).

Quadro 1 - Exemplo de fontes naturais e seus respectivos espectros de ação.

Planta	Espectro de ação
Coentro, Orégano, Alecrim e Salsa	Gram-positivo e negativo incluindo <i>L. monocytogenes</i>
Cominho	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Cl. botulinum</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Salmonella</i> e <i>Enteritidis</i>
Hortelã	Gram-positivo e negativo
Cebola	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> e <i>S. aureus</i>

Adaptada de Martin, 2011.

Os antimicrobianos naturais em alimentos são utilizados para conservação ao controlar o processo de deterioração natural e para evitar ou controlar o crescimento de

microrganismos patogênicos, conferindo segurança alimentar. Porém, a aplicação desses produtos como antimicrobianos naturais na indústria de alimentos ainda é pequena por três motivos principais: alto custo, dados limitados sobre seus efeitos nos alimentos e pelo odor forte (Tajkarimi et al., 2010).

Geralmente as bactérias gram-negativas são menos sensíveis a ação antimicrobiana dos compostos bioativos de plantas devido à presença da membrana lipopolissacarídea que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos (Tajkarimi et al., 2010). No trabalho de Shan et al., (2007) os autores avaliaram a atividade antimicrobiana de 46 extratos de especiarias alimentares e ervas medicinais contra cinco bactérias de origem alimentar (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e a *Salmonella anatum*). No geral, as bactérias gram-positivas foram mais sensíveis aos extratos que as gram-negativas. O *S. aureus* foi a mais sensível, ao passo que a *E. coli* foi a mais resistente.

Diversos trabalhos estão avaliando e demonstrando a atividade antimicrobiana *in vitro* e em alimentos dos mais diversos produtos de origem vegetal, tais como os extratos de orégano, erva mate, alecrim, ginseng, gengibre, caqui, laranja, limão, alho entre outros, revelando assim, possíveis alternativas para os antimicrobianos sintéticos utilizados nas indústrias de alimentos (Yin & Cheng, 2003; López et al., 2005; Milani et al., 2010; Ibrahim et al., 2011; Martin et al., 2013; Krishnan et al., 2014; Burris et al., 2015).

2.4.4. Bactérias gram-negativas

Com o auxílio da coloração de Gram, as bactérias podem ser divididas em gram-positivas e gram-negativas. As bactérias gram-positivas coram-se em roxo, enquanto as negativas, em rosa. A diferença de reação à coloração de Gram deve-se às diferenças na estrutura da parede celular das bactérias. As bactérias gram-negativas são caracterizadas por apresentarem parede celular composta por uma membrana citoplasmática (fosfolipídios e proteínas), uma camada de peptidoglicano, cerca de 10% da parede celular e uma membrana externa formada pela bicamada lipídica, proteínas e polissacarídeos, sendo que esta membrana externa corresponde a maior parte da parede celular. Já em bactérias gram-positivas, cerca de

90% da parede celular corresponde a peptidoglicano e estas não possuem a membrana externa (Madigan et al., 2010).

2.4.4.1. *Escherichia coli*

As *E. coli* são bactérias entéricas gram-negativas do trato intestinal de humanos e de muitos outros mamíferos. Sendo a célula desta bactéria uma das mais estudadas, sabe-se que esta possui uma membrana externa protetora, uma membrana plasmática interna que envolve o citoplasma e o nucleóide, que contém uma molécula circular única de DNA e, entre essas duas membranas, uma fina camada de peptidoglicanos, que fornece forma e rigidez à célula e esse conjunto consiste no envelope celular. A membrana plasmática é composta por uma fina bicamada lipídica penetrada por proteínas. A partir da membrana externa, projetam-se os pilos, pelos quais as células se aderem à superfície de outras células e algumas cepas da *E. coli* possuem um ou mais flagelos que auxiliam na mobilidade da célula (Nelson & Cox, 2006).

Para o adequado desenvolvimento e multiplicação, a *E. coli*. necessita de um ambiente com atividade de água mínima de 0,935, pH entre 4 e 9 (Forsythe, 2002) e temperatura ótima de 39°C, sendo a máxima de 48°C e a mínima de 8°C (Madigan et al., 2010).

Produzem colônias cor-de-rosa no ágar MacConkey, sendo que algumas linhagens formam colônias com brilho metálico em ágar eosina-azul de metileno (EMB) (Quinn et al., 2005) e alguns sorotipos são hemolíticos, formando halo de hemólise em ágar sangue (Oliveira, 2000).

2.4.4.2. *Proteus mirabilis*

O gênero *Proteus* está intimamente relacionado com o desenvolvimento de infecções do trato urinário, uma vez que são bactérias produtoras de urease, otites e mais raramente, a distúrbios gastrointestinais (Oliveira, 2000). Este gênero também está associado

ao desenvolvimento de pneumonias, contaminação de feridas e ao desenvolvimento de cálculos renais (Baron et al., 1994).

São bastonetes gram-negativos entéricos, aeróbios facultativos, oxidase negativa, catalase positiva, não esporulantes, e possuem exigências nutricionais relativamente simples. Não provocam hemólise em ágar sangue e em ágar MacConkey formam colônias incolores, pois não fermentam a lactose. Apresentam rápida motilidade por meio de flagelos e, conseqüentemente, possuem uma característica expansiva, em forma de "véu" no crescimento em placas de ágar (Oliveira, 2000).

2.5. Antioxidantes e antimicrobianos naturais

O crescimento microbiano e a oxidação lipídica são os fatores primários da deterioração de carnes durante o armazenamento sob refrigeração. Com o intuito de aumentar o período de armazenamento, a incorporação de aditivos antimicrobianos e antioxidantes, principalmente de origem sintética, é muito utilizada pela indústria. No entanto, os consumidores e as autoridades de saúde cada vez mais incentivam o uso de aditivos alimentares naturais (Govaris et al., 2005; Soares et al., 2012). Isso porque, segundo Pokorný, (2001), a maioria dos antioxidantes naturais são componentes alimentares comuns, e são usados na dieta humana por milhares de anos, de modo que os seres humanos estão adaptados ao seu consumo.

Os antioxidantes e antimicrobianos naturais podem melhorar a estabilidade e segurança de produtos cárneos. Todavia, a utilização de grandes quantidades desses extratos naturais pode levar a alterações nas propriedades sensoriais da carne. Desta forma, é interessante a utilização de extratos naturais com propriedades antimicrobianas e antioxidantes em baixas concentrações para evitar interferência nas características sensoriais do produto final (Ahn et al., 2007).

2.5.1. Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil)

A *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil é uma planta da família Aquifoliaceae do gênero *Ilex* (Lorenzi & Matos, 2008). O gênero *Ilex* compreende cerca de 450 espécies que estão naturalmente distribuídas em regiões tropicais (Ásia e América do Sul) e também em regiões temperadas (Berté et al., 2011)

É conhecida popularmente como erva-mate, mate e chá-mate. Apesar de ser chamada de erva, a planta é de porte arbóreo de até 20 metros de altura, dotada de copa densa e muito ramificada, possui folhas de cor verde escuro, simples, alternadas, com margens cerradas de 6 a 20 cm de comprimento. As flores são unissexuais brancas, pequenas e em fascículos axilares, tendo, frequentemente as masculinas e femininas na mesma inflorescência (Figura 9). O fruto é do tipo drupa, avermelhado, globoso, de polpa carnosa, com cerca de 5 a 8 sementes. (Lorenzi & Matos, 2008) e, geralmente, a floração ocorre de outubro a novembro e produção de frutos de março a junho (Heck & de Mejía, 2007).

É uma árvore resistente que não sofre muito com as oscilações climáticas, sendo capaz de resistir a períodos de temperaturas de até -6°C e à neve que são frequentes nas regiões montanhosas em que são encontradas, entretanto, requerem um regime de chuva rigoroso com distribuição por todo o ano. No Brasil, o cultivo e colheita da planta se dão pelo extrativismo da floresta natural ou pelo sistema misto, em que se combina o crescimento da floresta com melhores práticas de cultivo (Heck & de Mejía, 2007).



(A)

(B)

Figura 9 - (A) Árvore de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil), (B)- folhas e flores da *Ilex paraguariensis* St. Hil (Lorenzi& Matos; 2008).

A tradicional bebida à base das folhas secas e trituradas de erva-mate, que é muito apreciada na América do Sul, evoluiu de um chá produzido pela etnia Guarani e tornou-se uma bebida com características ritualísticas em algumas sociedades modernas da América do Sul. Atualmente é chamada de “chimarrão” no sul do Brasil, “mate” na Argentina e no Uruguai e de “tererê” no Paraguai (Bracesco et al., 2011).

Segundo os dados do IBGE (2005), o país produziu um total de 238.869 toneladas de erva-mate, sendo o principal produtor o estado do Paraná com 58,5% da produção nacional. Já em 2013 e 2014, a produção anual brasileira de erva mate cresceu e foi de 300.128 e 333.017 toneladas respectivamente, revelando um aumento de cerca de 11% no período. Neste último ano, a participação do Paraná foi cerca de 86,3% da produção nacional, sendo o município de São Mateus do Sul o maior produtor com 18,6 % da produção nacional (IBGE, 2014).

O mercado para bebida a base de chá mate, assim como comidas e suplementos dietéticos formulados a base da planta, cresceu devido principalmente à divulgação dos benefícios à saúde dos produtos a base da erva-mate pela mídia (Bastos & Torres, 2003; Heck & De Mejía, 2007). É muito utilizado tanto como uma fonte de cafeína e também como agente terapêutico pelas suas supostas propriedades farmacológicas (Bracesco et al., 2011). A erva-mate é exportada para a Ásia, Estados Unidos e Europa na forma de fármaco (folhas secas) ou extrato pra ser utilizado em alimentos, cosméticos ou como produto farmacêutico. Atualmente se observa um aumento no desenvolvimento de produtos da erva-mate, sendo hoje consumidos, cada vez mais, por populações que não consomem tradicionalmente as infusões de erva-mate (Berté et al., 2011).

O processamento do chá mate envolve diversas etapas que podem ser resumidas em colheita das folhas e caules, sapeco (passagem das folhas e caules sobre as chamas do sapecador a 500°C), secagem até alcançar umidade média de 4,5%, envelhecimento e embalagem (Schmalko & Alzamora, 2001). Segundo Isolabella et al. (2010), as folhas verdes possuem concentrações significativamente menores de compostos ativos como os derivados do cafeiolo, metilxantinas e flavonoides, quando comparado com as folhas que passaram pelo processamento.

Os compostos produzidos pela planta são separados em metabólitos primários e secundários, sendo os metabólitos primários aqueles relacionados diretamente à manutenção da vida da planta, como as proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos (Raven et al., 2001). Já os compostos secundários são restritos à sua distribuição e, apesar de não serem essenciais a vida da planta, garantem vantagens para a sua sobrevivência (Simões et al.,

2007). Existem três classes principais de metabólicos vegetais secundários, a classe dos alcalóides, na qual se encontram as metilxantinas; a classe dos terpenos, que incluem os óleos essenciais e a classe dos compostos fenólicos, que envolve os ácidos fenólicos taninos e flavonóides (Raven et al., 2001). Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem pelo menos um anel aromático e têm sido associados a várias funções, dentre elas à atividade antioxidante (Raven et al., 2001) e antimicrobianos (Asolini et al., 2006).

A composição química do gênero *Ilex* é variável, pois a presença de compostos químicos nas plantas pode ser afetada por diversos fatores como o estágio de desenvolvimento da planta, da parte da planta utilizada, da época da colheita, das características climáticas, das condições do solo e da luminosidade (Valduga et al., 1995; De Biasi et al. 2009, Pagliosa, 2009). As plantas podem conter diversos compostos bioativos tais como as metilxantinas da classe dos alcalóides, como cafeína, teobromina e teofilina que são encontradas em sua maioria nas folhas; compostos fenólicos, cujos principais representantes na erva-mate são os ácidos cafêicos, os ácidos clorogênicos e seus derivados e os flavonóides como a rutina; as saponinas triterpenóides derivadas principalmente dos ácidos ursólico; vitaminas tais como A, E e complexo B e minerais como cálcio, nitrogênio, alumínio, potássio, manganês e ferro (Valduga et al., 1997; Filip et al., 2001; Ribani, 2006; Heck & de Mejía, 2007; Lorenzi & Matos, 2008; Pagliosa, 2009).

O teor de cafeína na *Ilex paraguariensis* é mais elevado nas folhas novas, alcançando até 2,2%, valor semelhante ao encontrado no café e no chá-preto (Lorenzi & Matos, 2008; Gruenwald, 2000). A espécie possui ainda maiores concentrações dos derivados de cafeoil, como o ácido clorogênico e o ácido cafêico, e também maiores concentrações de flavonoides, como a rutina e a quercetina, quando comparado com outras espécies do gênero *Ilex* (Filip et al., 2001).

A distribuição dos compostos fenólicos em tecidos vegetais também não é uniforme, uma vez que os tecidos mais externos podem apresentar maior concentração de polifenóis que as camadas mais internas (Naczki & Shahidi, 2006). Segundo Turkmen et al. (2006), o método de extração também exerce influência sobre a quantidade obtida de fenóis. Além disso, o tipo de cultivo da *Ilex paraguariensis* também pode afetar a composição fenólica das plantas, uma vez que plantas oriundas de plantação comercial apresentaram maiores concentrações de ácidos fenólicos que aquelas oriundas de florestas naturais (Heck et al., 2008).

Em relação aos efeitos na saúde, já foram relatadas diversas atividades da erva-mate, que incluem o efeito antioxidante, redutor de peso, estimulante do sistema nervoso

central, diuréticos, redução do colesterol, hepatoprotetor, propriedades antitumorais, miorelaxante, vasodilatadora, antiparasitárias, antimicrobiano, dentre outras (Duke, 1992; Filip et al., 2000; Opala et al., 2006; Heck & De Mejía, 2007; Pagliosa et al., 2010; Meinhart et al., 2010; De Biasi et al., 2009).

2.5.1.1. Atividade Antioxidante

Diversos estudos vêm demonstrando um importante efeito antioxidante da erva-mate (Filip et al., 2000; Schinella et al., 2000; Heck & de Mejía, 2007; Berté et al., 2011; Colpo, 2012), devido a alta concentração de polifenóis (Berté et al., 2011), sendo os derivados de cafeoil e os flavonóides os constituintes mais relevantes para a atividade antioxidante da erva-mate (Ribani, 20006; Heck & De Mejía, 2007). Segundo Filip et al. (2000), os derivados de cafeoil encontrados no mate incluem o ácido caféico, o ácido clorogênico e os ácidos 3, 4-dicafeoilquinico, 3,5-dicafeoilquinico e 4, 5- dicafeoilquinico. Colpo (2012) acrescenta ainda as metilxantinas, além dos compostos fenólicos, como fundamentais para conferir essa atividade antioxidante devido a sua capacidade de atuar como “seqüestradores” de radicais livres e quelantes de metais.

Matsumoto et al. (2009) avaliaram o consumo regular de chá mate por mulheres e observaram a melhoria das defesas antioxidantes por diferentes mecanismos, tanto pelo aumento da circulação de compostos bioativos, assim como pela modulação das enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase, que são responsáveis por combater o estresse oxidativo.

Dentre as plantas do gênero *Ilex*, a *I. paraguariensis* apresenta maior atividade antioxidante, devido à concentração dos derivados de cafeoil (Filip et al., 2000), especialmente o ácido clorogênico, sendo provavelmente o principal responsável por essa atividade (Anesini et al., 2006).

A atividade antioxidante está correlacionada positivamente com a concentração de polifenóis da erva-mate que possuem a capacidade de desativar as espécies reativas de oxigênio (ROS) como o ânion superóxido (O₂⁻) (Schinella et al., 2000; Heck & De Mejía, 2007) e de remover os radicais livres (Schinella et al., 2000; Berté et al., 2011). Cerca de um

quarto dos sólidos presentes nas infusões da erva-mate é constituído de compostos fenólicos, sendo que tanto o mate verde quanto o chá mate apresentaram atividade antioxidante similares, indicando que a fase de tostagem não afeta a capacidade antioxidante, apesar de modificar o perfil dos compostos voláteis e o conteúdo de fenóis (Bastos et al., 2006).

Uma vez estabelecidas as principais moléculas responsáveis pela atividade antioxidante da *I. paraguariensis*, alguns autores compararam o efeito antioxidante da erva-mate com o de substâncias já conhecidas por serem bons antioxidantes, como o ácido ascórbico. Pelo teste da enzima catalase, o ácido ascórbico apresentou um forte poder de remoção de radicais livres, assim como a erva-mate, porém no teste do radical DPPH, o extrato de erva-mate se mostrou 99,04% mais eficiente que o ácido ascórbico, o que se explica pelas altas concentrações de polifenóis (Berté et al., 2011). Já frente a um antioxidante sintético, a erva-mate apresentou a mesma eficácia constatada pelo BHT na prevenção da oxidação do ácido linoléico (Bastos et al., 2006).

Vários trabalhos científicos avaliam a atividade antioxidante de diversos chás e frutas na preservação de produtos cárneos. Milani et al. (2010) avaliaram o efeito da utilização do extrato de caqui a 0,5 e 1% e da erva-mate a 0,5% na prevenção da oxidação lipídica em carnes de frango submetidas ao tratamento térmico. O extrato de erva-mate apresentou maior concentração de compostos fenólicos totais em comparação com o caqui, porém, na análise da oxidação pelo método de TBARS, o extrato de erva-mate apresentou resultados estatisticamente similares. No entanto, a adição do extrato de erva mate provocou alterações negativas na coloração e no sabor da carne. Da mesma forma, Racanicci et al. (2009) também avaliaram sensorialmente almôndegas de carne de frango adicionadas de 0,05 ou 0,1% do extrato aquoso ou folhas secas de erva-mate. Os autores verificaram que a adição de 0,05% não afetou o aroma nem o sabor dos produtos cárneos, porém a adição de 0,1% do extrato aquoso alterou o aroma e a adição de 0,1% de folhas secas alterou tanto o sabor quanto o aroma, entretanto, a alteração no sabor do produto não foi considerada um aspecto negativo pelo painel sensorial.

2.5.1.2. Atividade Antimicrobiana

Diversas pesquisas têm demonstrado os aspectos positivos da adição da erva mate (*Ilex paraguariensis*) em alimentos em relação à atividade antimicrobiana *in vitro*. O

ácido caféico, juntamente com os flavonóides, presentes na erva-mate, já se mostraram eficientes antimicrobianos frente a bactérias, fungos e vírus (Cowan, 1999; Cushnie & Lamb, 2005). Além desses compostos, os polifenóis encontrados na erva mate, como a cafeína, derivados do cafeoil, ácido clorogênico, quercitinas, rutinas e teobrominas, contribuem para a atividade antimicrobiana contra patógenos de origem alimentar (Burris et al., 2012).

No trabalho realizado por Kubo et al. (1993), os autores estudaram amostras de erva-mate provenientes do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina, e encontraram dez principais compostos ativos que apresentaram atividade antimicrobiana quando desafiados contra bactérias e fungos. Os compostos encontrados foram: linalol, α -ionona, β -ionona, α -terpineol, ácido octanóico, geraniol, 1-octanol, nerolidol, geranilacetona e eugenol. Apesar das pequenas variações encontradas nas amostras a partir das diferentes localizações, a maior parte dos compostos voláteis foi identificada em todas as amostras de mate dos diferentes locais.

No entanto, apesar da maioria dos compostos majoritários presentes na erva mate serem conhecidos, existe uma dificuldade de identificar exatamente quais compostos efetivamente contribuem para a atividade antimicrobiana (Burris et al., 2012).

Ao contrário da atividade antioxidante, alguns trabalhos sugerem que a concentração de compostos fenólicos não determina a atividade antibacteriana, mas sim a natureza dos compostos fenólicos presente nos extratos (Asolini et al., 2006). Isso porque, ainda que o extrato aquoso de erva mate tenha apresentado uma grande quantidade de compostos fenólicos totais, nenhuma atividade antibacteriana foi observada sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*.

Diversos trabalhos demonstraram o poder antimicrobiano do extrato de *I. paraguariensis* frente a uma ampla gama de microrganismos. Na década de 90 foi comprovada a eficácia de extratos de erva-mate contra bactérias e fungos tais como: *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e os fungos *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Pityrosporum ovale*, *Penicillium chrysogenum* e *Trichophyton mentagrophytes*, sendo os melhores resultados obtidos frente a bactérias gram-positivas (Kubo et al., 1993). Em estudos mais recentes, foi verificada atividade antimicrobiana de folhas ramos e cambitos da erva-mate frente aos microrganismos *Candida albicans*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (De Biasi et al., 2009), *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Lexington*, *Salmonella derby*, *Salmonella enterica* e *Salmonella infantis* (Girolometto et al., 2009; Bona et al., 2010). Já a

eficácia da erva-mate frente à *Escherichia coli* diverge entre os diferentes autores (Kubo et al., 1993; De Biasi et al., 2009; Girolometto et al., 2009).

CAPÍTULO 2

Atividade antioxidante do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) adicionado em almôndegas carne de peito de frango

1. RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição do extrato de folhas de erva-mate (EM) sobre a estabilidade oxidativa dos lipídios da carne do peito de frango. A carne fresca e desossada foi obtida diretamente de abatedouro comercial, moída e dividida em cinco tratamentos, sendo: controle negativo: sem adição de extrato (CN); 0,05% (0,05EM); 0,10% (0,10EM); 0,15% (0,15EM) e 0,20% (0,20EM) de extrato liofilizado de erva-mate por quilo de carne. Almôndegas de aproximadamente (30g ±0,5) foram pré-cozidas e armazenadas sob refrigeração (4°C) por 10 dias. O acúmulo dos compostos secundários da oxidação durante o armazenamento foi acompanhado pela determinação da concentração de TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) a cada dois dias em duplicata em carnes de frango pré-cozidas. Os resultados foram analisados utilizando-se o PROC GLM e PROC REG e o teste Tukey do programa estatístico SAS[®] 5.1. A adição de 0,10; 0,15 e 0,20EM protegeu eficientemente os lipídios durante o processo de cozimento, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas (P>0,05) nos valores médios de TBARS entre as amostras cruas e cozidas. De forma geral, a incorporação do extrato de EM reduziu (P<0,0001) a produção de compostos secundários da oxidação durante o armazenamento refrigerado exercendo ação antioxidante nas almôndegas de carne de peito de frango pré-cozidas, independente da concentração utilizada, quando comparado ao CN. Além disso, em todos os períodos analisados foi possível observar regressão quadrática significativa (P<0,0001) entre os diferentes tratamentos, permitindo estimar em 0,18% a concentração de EM mais eficiente no controle da oxidação em carnes nas condições deste estudo.

Palavras-Chave: Antioxidante natural, estabilidade da carne de frango, oxidação lipídica, TBARS.

Antioxidant capacity of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) added to pre-cooked chicken breast meatballs

2. ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effect of the addition of lyophilized yerba mate extract (YME) on the oxidative stability of breast meat lipids. The fresh, deboned and ground chicken breast meat was divided into five treatments: negative control, with no antioxidant (NC); 0.05%, 0.10%, 0.15% and 0.20% of YME per kilogram of meat (0.05YME; 0.10YME; 0.15YME and 0.20YME). Twenty meatballs (30g±0.5) were produced for each treatment, pre-cooked (100°C during 10 min) and stored packed in a permeable to oxygen plastic bag under 4 °C up to 10 days. In order to evaluate the antioxidant activity of the extract, the accumulation of secondary lipid oxidation compounds was monitored during storage using TBARS method (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) every two days in duplicate in raw and precooked meatballs. PROC GLM, PROC REG and Tukey test were applied using SAS[®] 5.1 statistical software. The addition of 0.10%; 0.15% and 0.20% YME effectively protected lipids during cooking, since no differences (P>0.05) were found in TBARS values among raw and cooked samples. The addition of YME reduced (P <0.0001) the production of secondary lipid oxidation compounds acting as a natural antioxidant in pre-cooked chicken breast meatballs during 10 days of chilled storage regardless the concentration used, when compared to NC. In addition, as the YME concentration increased in meatballs TBARS values decreased (P<0.0001) allowing to estimate 0.18% YME the most effective concentration to control lipid oxidation in chicken meatballs under the conditions of this study.

Keywords: Natural antioxidant, secondary lipid oxidation compounds, stability of chicken meat, lipid oxidation, TBARS.

3. INTRODUÇÃO

A auto-oxidação dos lipídios é um processo destrutivo natural, sendo o mais comum que leva à deterioração dos alimentos. Durante o processo de peroxidação lipídica, ocorre a formação de produtos secundários da oxidação, que levam a rancidez dos alimentos devido às alterações sensoriais que ocorrem nos produtos oxidados, causando rejeição destes pelos consumidores (Gordon, 2001).

Carnes cozidas são mais susceptíveis à peroxidação lipídica devido à aceleração do processo de oxidação que ocorre durante o aquecimento (Lima Junior et al., 2013). Além disso, o grau de insaturação dos ácidos graxos da carne pode contribuir para a ocorrência e velocidade da oxidação, sendo as carnes com maior grau de insaturação mais susceptíveis (Nelson & Cox, 2006). Segundo Mariutti & Bragagnolo, (2009), a carne de frango possui alto teor de ácidos graxos insaturados e conseqüentemente, maior susceptibilidade a oxidação.

Uma vez que a oxidação lipídica em alimentos é uma das principais causas de redução do tempo de prateleira desses produtos, faz-se necessário a utilização de estratégias para evitar ou retardar este processo. Dentre elas, se destacam a utilização de embalagens à vácuo ou com atmosfera controlada para reduzir a quantidade de oxigênio, o uso de baixas temperaturas e a adição de antioxidantes sintéticos ou naturais (Pokorný, 2001; Tang et al., 2001; Milani et al., 2010; Camel et al., 2012).

Atualmente, no intuito de aumentar o tempo de prateleira dos alimentos, ocorre um uso massivo de antioxidantes sintéticos nas indústrias, porém a preferência por produtos naturais vêm crescendo devido à grande preocupação dos consumidores com a correlação positiva entre a da adição de produtos sintéticos e o desenvolvimento de problemas de saúde (Mariutti & Bragagnolo, 2009). Devido à alta demanda dos consumidores por produtos naturais e ao interesse da indústria alimentícia e farmacêutica por esse tipo de compostos

bioativos naturais capazes de conferir benefícios à saúde, o estudo de possíveis aditivos naturais e seus efeitos antioxidantes vêm sendo estimulado (Kanatt et al., 2007), porém os mesmos ainda não são amplamente utilizados nas indústrias devido à disponibilidade limitada desses compostos (Tang et al., 2001).

Diversos trabalhos demonstram os benefícios da adição de plantas sobre a inibição da oxidação lipídica em produtos cárneos. A utilização da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil tem se mostrado uma fonte alternativa e efetiva na inibição da oxidação e, conseqüentemente, aumento do tempo de prateleira desses produtos (Bastos et al., 2006; Matsumoto et al., 2009, Colpo, 2012; Camel et al., 2012). Segundo Kanatt et al., (2007), as fontes vegetais podem ser utilizadas na indústria de alimentos como antioxidantes mais seguros e muitas vezes melhores, promovendo uma boa proteção contra os danos oxidativos e consequente formação de ranço, que ocorrem nos alimentos processados.

A *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil é uma planta da família Aquifoliaceae, conhecida popularmente como erva-mate (Lorenzi & Matos, 2008). É utilizada na preparação de bebidas tradicionalmente consumidas em diversos países da América do Sul, em que se utilizam as folhas secas e trituradas da erva-mate (Bracesco et al., 2011). A composição química do gênero *Ilex* é bastante variável, mas se observam diversos compostos bioativos, tais como as metilxantinas, compostos fenólicos cujos principais representantes na erva-mate são os ácidos caféico, os ácidos clorogênicos, e seus derivados, e os flavonóides (Heck & de Mejía, 2007; Lorenzi & Matos, 2008). O mate possui diversos compostos fenólicos, sendo os derivados de cafeoil juntamente com os flavonóides, os constituintes mais relevantes para a atividade antioxidante da planta (Ribani, 20006; Heck & De Mejía, 2007).

O objetivo desse estudo foi investigar o efeito da adição de diferentes concentrações de extrato de erva-mate na estabilidade oxidativa de produto feito a base de carne do peito de frango pré-cozido e armazenado sob refrigeração.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras de carne e do extrato

A carne de peito de frango fresca foi disponibilizada por um abatedouro comercial localizado no Distrito Federal fiscalizada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). Logo após o abate, os frangos passaram por todos os processos rotineiros de um abate comercial de aves conforme a portaria 210 de 10 de novembro de 1998 instituída pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. As amostras de peito utilizadas no presente trabalho foram recebidas com a embalagem original da empresa, contendo cerca de 2 a 3 peitos de frangos por pacote e refrigeradas a 4°C em câmara fria. As amostras foram acondicionadas em uma caixa de isopor com gelo durante o transporte até o Laboratório de Nutrição Animal (LNA) da Universidade de Brasília (UnB) na fazenda Água Limpa, onde foram congeladas em freezer comercial para conservação até o dia das análises.

O extrato liofilizado de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) foi cedido pela empresa Centro Flora, localizada em São Carlos no estado de São Paulo. Este extrato foi obtido a partir de folhas por meio de extração com água (65-85%) e etanol (15-35%) sem a adição de nenhum conservante. Após a extração, foi feita a concentração e secagem do produto, que foi submetido a análises físico-químicas e microbiológicas. Os resultados obtidos estão apresentados no Anexo 1. Além disso, amostras do extrato liofilizado também foram analisadas no Laboratório de Química da USP, em São Carlos/SP, para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos majoritários, usando um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução UHPLC-MS com ionização por electrospray (ESI) (Anexo 2).

4.2. Conteúdo de fenólicos totais do extrato

A determinação do conteúdo de fenólicos totais foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin–Ciocalteu descrito por Singleton et al. (1999). O ensaio foi realizado em duplicata e a absorbância da amostra foi comparada com a curva padrão construída com ácido gálico (com concentração de 10 µg/ml a 500 µg/ml). O conteúdo de fenólicos totais foi expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato.

4.3. Composição bromatológica da carne

Para a análise da composição bromatológica da carne do peito foram avaliados a umidade, a proteína bruta, o teor de lipídios totais e a cinza. As análises foram feitas em triplicata a partir do "pool" de amostras de carne do controle negativo (sem adição de extrato).

Para a determinação do percentual de umidade, foi obtido o teor de matéria seca segundo a AOAC (1990) e o teor de umidade foi calculado por diferença em relação ao total (100%). Para determinar o teor de proteína bruta foi utilizado o método de Kjeldahl (AOAC, 1990), que é baseado na determinação da concentração de nitrogênio total. A determinação dos lipídios totais foi executada utilizando-se o método de extração à quente, conforme descrito pela AOAC (1990). O teor de cinza foi obtido segundo a metodologia descrita pela AOAC (1990).

4.4. Ensaio acelerado de oxidação lipídica

Para o ensaio da oxidação lipídica, cerca de 7,5kg de carne de peito de frango, sem osso, sem pele e gorduras adjacentes, foram moídos, misturados e divididos em 5 tratamentos. Os tratamentos empregados foram: controle negativo (sem adição de extrato de EM, CN); adição de 0,05% de EM (0,05EM); adição de 0,10% de EM (0,10EM); adição de 0,15% de EM (0,15EM) e adição de 0,20% de EM (0,20EM) por quilo de carne. O extrato

foi adicionado em forma de pó liofilizado nas diferentes concentrações conforme os tratamentos, juntamente com 0,5% de sal.

Após a homogeneização de cada tratamento, foram confeccionadas 20 almôndegas com $30\text{g} \pm 0,05\text{g}$ cada, que foram embaladas à vácuo e pré-cozidas em banho-maria a 100°C por 10 minutos, segundo metodologia descrita por Racanicci et al. (2004). As almôndegas de carne foram reembaladas utilizando embalagens permeáveis ao oxigênio e mantidas sob refrigeração (4°C) na ausência de luz em câmara fria durante 10 dias. A quantificação dos malonaldeídos foi utilizada para acompanhar o processo de oxidação através da metodologia de TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) descrita por Madsen et al. (1998). A análise foi efetuada a cada dois dias (0, 2, 4, 6, 8 e 10) em duplicata, utilizando duas almôndegas de carne para cada tratamento por dia. No primeiro dia de análise, além das amostras cozidas foram realizadas as avaliações nas almôndegas que não passaram pelo processo de cozimento (cruas).

Em cada amostra ($5\text{g} \pm 0,05$) foram adicionados 15ml de ácido tricloroacético (TCA) 7,5% diluído em água miliQ com 0,1% de EDTA e 0,1% de propilgalato (PG). As amostras foram homogeneizadas por 45 segundos e em um Ultra-Turrax (13.500 rpm) e posteriormente filtradas com o auxílio de papel filtro comum. Cinco mililitros do filtrado foram transferidos para um tubo de ensaio com tampa de rosca e adicionados a cinco mililitros da solução de 0,020 M TBA (2-ácido tiobarbitúrico) e levados a um banho-maria (100°C) por 40 minutos. Após este tempo, as amostras foram resfriadas em água com gelo por mais 40 minutos para a mensuração da absorbância (A) a 532 e 600nm pelo espectrofotômetro (Femto 600 Plus), sendo a diferença ($A_{532} - A_{600\text{ nm}}$) usada para corrigir a turbidez das amostras. Os resultados foram expressos em μmol de malonaldeído (MDA) por kg de carne aplicando a curva padrão (0,1 a 6,0 nM) construída com tetraetoxipropano (TEP).

Os resultados também foram usados para calcular a percentagem de inibição (PI) da oxidação lipídica, conforme descrito por Tang et al. (2001), utilizando-se as somas dos valores de TBARS de todos os dias de análise dos diferentes tratamentos, através da fórmula:

$$\text{PI} = (\text{controle} - \text{tratamento}) \div \text{controle} \times 100$$

4.5. Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com um controle negativo e quatro concentrações de extrato, totalizando cinco tratamentos experimentais. As análises foram realizadas em duplicata com quatro repetições por tratamento e dia de análise.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância (GLM) utilizando software estatístico SAS[®] (SAS 5.1). Os dados do TBARS foram submetidos à análise de regressão entre os diferentes tratamentos para cada dia de análise por meio do PROC REG do software estatístico SAS[®] 5.1. Dentro de cada tratamento, nos diferentes dias de análise, as diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey, com o nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conteúdo de fenólicos totais encontrado nas amostras do extrato de erva-mate foi de 143,89mg EAG.g⁻¹ de amostra, em média. Resultado similar (145mg EAG.g⁻¹ de amostra) foi encontrado por Asoline et al. (2006) para o extrato aquoso de erva-mate, mas superiores aos resultados encontrados por Racanicci et al. (2008) que obtiveram 83 mg EAG g⁻¹ de amostra no extrato aquoso de erva-mate, por Pagliosa (2009) que obtiveram 70,1mg EAG.g⁻¹ em extrato aquoso e por Burris et al. (2015) com 77mg EAG g⁻¹ de amostra em extrato aquoso liofilizado. Apesar do elevado conteúdo de fenólicos, isto não necessariamente significa que o extrato apresenta alta atividade antioxidante (Kahkonen et al., 1999).

Os valores médios da composição centesimal da carne do peito de frango sem pele e gorduras adjacentes foi de 75,38±0,24% de umidade, 23,95±1,82% de proteína bruta, 1,11±0,2% de lipídios totais e 1,44±0,06% de cinza. Esses dados revelam que a carne utilizada no presente trabalho apresentou maior teor de proteína e menor teor de gordura, quando comparada aos dados de referência da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), que apresenta valores de 21,5% de proteína bruta e 3% de lipídios totais (NEPA, 2011). No entanto, o resultado encontrado para o percentual de lipídios se aproximou mais dos valores de Cantor et al. (2008), que obtiveram cerca de 1,7% de lipídios e ao encontrado por de Smet et al. (2008), com 0,94%. Essas variações podem estar relacionadas a diversos fatores, como nutrição, genética e sexo das aves (Novello et al., 2008, Faria et al., 2009).

Os valores médios mensurados para os compostos secundários da oxidação lipídica pelo método TBARS nas almôndegas de carne de frango antes e após o cozimento sem refrigeração estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Média dos compostos secundários da oxidação lipídica ($\mu\text{mol MDA/kg}$ de carne) em almôndegas de carne do peito de frango cruas e cozidas sem refrigeração submetidas aos tratamentos controle negativo, sem adição de extrato de erva-mate (EM) (CN); adição de 0,05% de EM (0,05EM); adição de 0,10% de EM (0,10EM); adição de 0,15% de EM (0,15EM) e adição de 0,20% de EM (0,20EM).

	Tratamentos				
	CN	0,05EM	0,10EM	0,15EM	0,20EM
Crua	0,599 ^b	0,626 ^b	0,567 ^a	0,612 ^a	0,719 ^a
Cozida	2,914 ^a	1,229 ^a	0,606 ^a	0,630 ^a	0,668 ^a
P	<0,0001	<0,0001	ns	ns	ns
CV	8,39	4,73	13,13	9,36	13,93

^{a, b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste Tukey.

ns: não significativo na análise de variância a 5%.

CV: Coeficiente de variação (%)

n= 4

Como esperado, houve diferença significativa ($P < 0,0001$) na comparação entre as almôndegas submetidas ao cozimento em relação às almôndegas cruas para o CN e para o tratamento com 0,05% de erva-mate, sendo observado maior grau de dano oxidativo. Isso ocorre uma vez que o calor do cozimento altera a permeabilidade das membranas celulares, o que facilita a interação entre os agentes oxidantes com os ácidos graxos insaturados da membrana celular. Além disso, as altas temperaturas desnaturam proteínas que liberam íons de ferro que intensificam do processo oxidativo (Lima Junior et al., 2013). Porém, não houve diferença significativa entre as almôndegas cozidas e cruas nos tratamentos 0,10, 0,15 e 0,20EM, indicando que essas três concentrações do extrato foram capazes de proteger os lipídios inibindo o processo de oxidação provocado pelo calor.

O gráfico 1 e a Tabela 3 apresentam as médias da concentração de malonaldeídos (MDA) avaliadas nas almôndegas de carne de peito de frango pré-cozidas e armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.

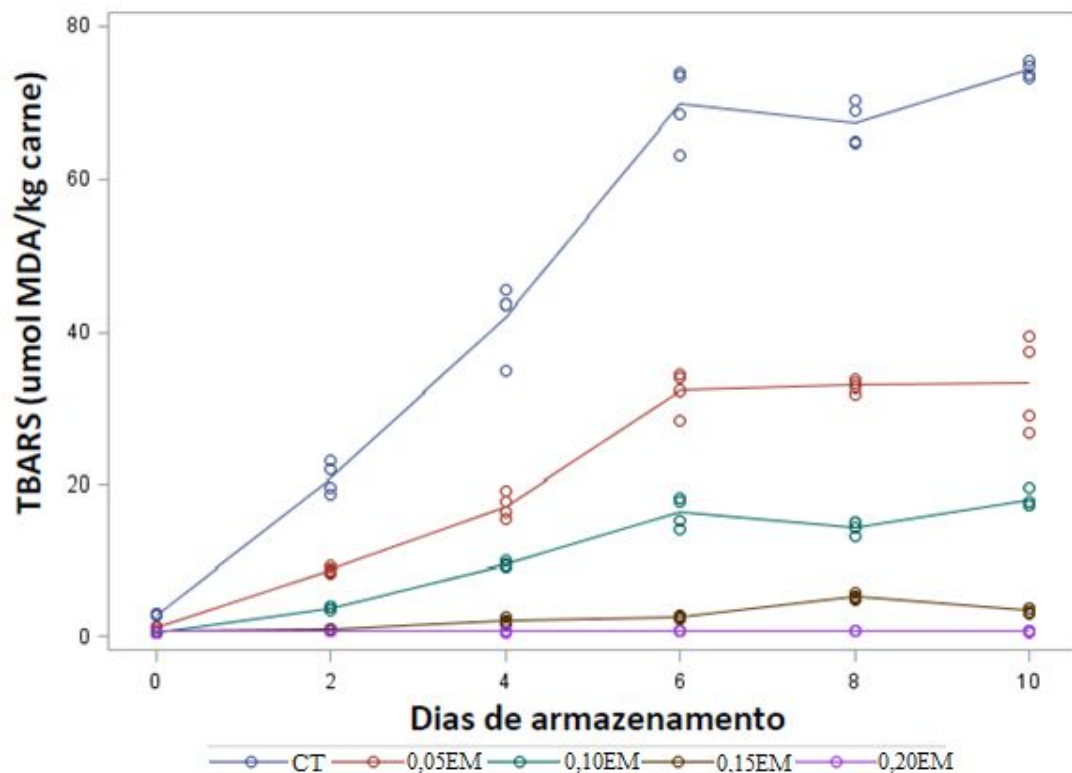


Gráfico 1 - Concentração de MDA ($\mu\text{mol kg}^{-1}$ de carne) em almôndegas adicionadas ou não de extrato de erva-mate durante 10 dias de armazenamento refrigerado.

Foram detectadas diferenças significativas ($P < 0,0001$) entre os tratamentos aplicados para a progressão da oxidação lipídica no decorrer dos dez dias de armazenamento, sendo que a adição do extrato de erva-mate provocou redução na produção de malonaldeídos em relação ao controle negativo (sem antioxidantes), o que sugere intensa atividade antioxidante na preservação dos lipídios do produto cárneo.

O extrato utilizado neste estudo foi confeccionado com folhas de *Ilex paraguariensis* e segundo Filip et al. (2001), as folhas apresentam elevado teor de flavonoides e derivados de cafeoil, que estão intimamente relacionados com as propriedades antioxidantes desempenhada pelo mate.

Camel et al. (2012) também testaram a utilização de extrato de erva-mate em diferentes concentrações (0,125% e 0,25%) na preservação de amostras de carne de frango que foram assadas e armazenadas. Assim como no presente trabalho, os autores verificaram que a maior concentração do extrato levou a maior estabilidade ($P < 0,05$) dos lipídios da sobrecoxa, através da inibição da oxidação lipídica, também avaliada pelo método de TBARS.

Tabela 3 - Média dos compostos secundários da oxidação lipídica ($\mu\text{mol MDA/kg}$ de carne) em almôndegas de carne do peito de frango submetidas aos tratamentos controle negativo, sem adição de extrato de erva-mate (EM)- CN; adição de 0,05% de EM (0,05EM); adição de 0,10% de EM (0,10EM); adição de 0,15% de EM (0,15EM) e adição de 0,20% de EM (0,20EM) durante o armazenamento refrigerado.

Tratamentos	Dias					
	0	2	4	6	8	10
CN	2,914 ^d	20,822 ^c	41,894 ^b	69,787 ^a	67,269 ^a	74,398 ^a
0,05EM	1,229 ^d	8,739 ^c	17,183 ^b	32,281 ^a	32,895 ^a	33,163 ^a
0,10EM	0,606 ^c	3,829 ^d	9,442 ^c	16,344 ^{ab}	14,361 ^b	18,046 ^a
0,15EM	0,630 ^d	0,930 ^d	2,063 ^c	2,506 ^c	5,326 ^a	3,480 ^b
0,20EM	0,668 ^a	0,686 ^a	0,633 ^a	0,713 ^a	0,771 ^a	0,688 ^a
P	<0,0001 ¹	<0,0001 ²	<0,0001 ³	<0,0001 ⁴	<0,0001 ⁵	<0,0001 ⁶
CV	8,68	13,13	15,8	11,22	5,46	11,02

CV: Coeficiente de variação (%)

^{a, b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste Tukey.

n=4

$$Y^1 = 2,81176 - 0,00336x + 0,00000117x^2 / R^2 = 0,9614$$

$$Y^2 = 20,28701 - 0,02430x + 0,00000734x^2 / R^2 = 0,9800$$

$$Y^3 = 40,47461 - 0,04634x + 0,00001341x^2 / R^2 = 0,9668$$

$$Y^4 = 68,41382 - 0,0756x + 0,00002101x^2 / R^2 = 0,9848$$

$$Y^5 = 66,14265 - 0,07187x + 0,00001994x^2 / R^2 = 0,9931$$

$$Y^6 = 72,43778 - 0,07967x + 0,00002212x^2 / R^2 = 0,9806$$

No trabalho de Racanicci et al. (2008), os autores também avaliaram o efeito antioxidante, pelo método de TBARS, da erva-mate adicionada nas concentrações de 0,05 e 0,10% em almôndegas pré-cozidas de carnes de peito de frango armazenadas a 5°C por 10 dias. Assim como no presente trabalho, as duas concentrações de mate foram eficientes para inibir a oxidação lipídica na carne de frango, porém, as mesmas concentrações utilizadas nesse trabalho produziram menores valores de TBARS durante os 10 dias de armazenamento.

Conforme esperado, durante o armazenamento refrigerado, houve um crescente aumento ($P < 0,05$) na formação de compostos secundários da oxidação lipídica para as amostras dos tratamentos CN, 0,05EM, 0,10EM e 0,15EM. Por outro lado, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na formação de compostos secundários da oxidação durante todo o período de armazenamento nas almôndegas submetidas ao tratamento 0,20EM, demonstrando eficiente atividade antioxidante frente aos danos oxidativos (Tabela 3). Ainda é possível observar que o tratamento 0,15EM, apesar de não conseguir inibir o processo de

oxidação lipídica durante o armazenamento como observado no tratamento 0,20EM, também foi eficiente no controle do processo oxidativo quando comparado com os tratamentos CN, 0,05EM e 0,10EM.

Através da análise da regressão, foi possível observar regressões quadráticas significativas ($P < 0,0001$) entre os diferentes tratamentos aplicados, formando parábolas com a concavidade voltada para cima em todos os dias analisados (Tabela 3). Observa-se também que os coeficientes de determinação (R^2) das equações foram elevados, demonstrando que a formação dos compostos secundários da oxidação está intimamente relacionada às concentrações de erva-mate utilizadas.

Os pontos de inflexão das parábolas traçadas para as concentrações de mate que apresentaram menores valores de TBARS foram: 0,14%, 0,16%, 0,17%, 0,18%, 0,18% e 0,18% para os dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10, respectivamente. Apesar do tratamento 0,20EM ter se mostrado eficiente na prevenção da oxidação lipídica, controlando a produção de TBARS a níveis baixos durante todo o período de armazenamento, as equações de regressão indicam concentrações ligeiramente inferiores no ponto de inflexão das curvas (Figura 10).

Alguns trabalhos demonstram que a adição de altos níveis de extratos naturais podem ser menos eficientes no controle da oxidação lipídica quando comparados com dosagens mais baixas. No trabalho desenvolvido por Smet et al. (2008), os autores verificaram que a suplementação dietética de extrato de chá verde a 200mg/kg apresentou maior concentração de MDA ($P < 0,05$) em hambúrgueres crus de carne de peito de frango, quando comparado com a concentração de 100mg/kg. Outros autores também encontraram dados semelhantes, em que o aumento das concentrações de antioxidantes implicou em um efeito pró-oxidante dos tocoferóis e da vitamina C (Ramalho & Jorge, 2006; Cerqueira et al., 2007).

Os compostos fenólicos, presentes em grande quantidade na erva-mate, apesar de serem considerados eficientes antioxidantes, podem atuar como pró-oxidantes em certas condições, uma vez que são capazes de quelar metais de maneira a aumentar ou manter a atividade catalítica, ou reduzir metais, aumentando sua capacidade de formar radicais livres através de peróxidos (Decker, 1997).

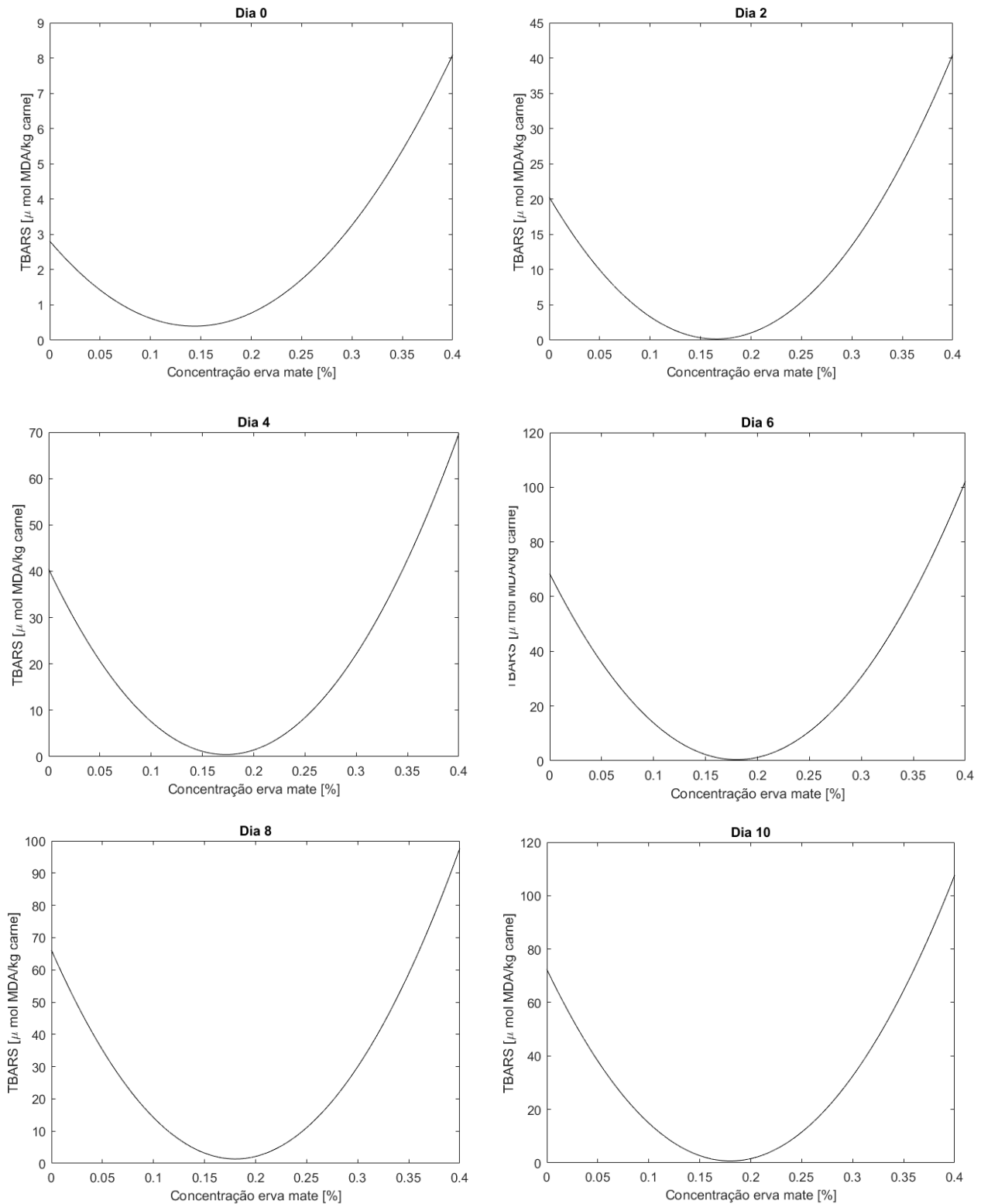


Figura 10– Construção das curvas de regressão para as concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA Kg}^{-1}$ de carne) de acordo com as diferentes concentrações do extrato EM durante o armazenamento refrigerado.

O cálculo da porcentagem de inibição (PI) da oxidação lipídica revelou que a medida que adição do extrato de erva-mate aumentou nas almôndegas de carne, maior foi a porcentagem encontrada, sendo: 54% para 0,05EM; 77,39% para 0,10EM; 94,60% para 0,15EM e 98,49% para 0,20EM. Os tratamentos 0,15EM e 0,20EM apresentaram os maiores valores de PI e, conseqüentemente, alta atividade antioxidante em almôndegas de peito de frango pré-cozidas e armazenadas sob refrigeração.

Resultados similares (94,88% de PI) foram encontrados por Milani et al. (2010) utilizando a metodologia de TBARS em coxas e sobrecoxas de frango cozidas e armazenadas sob resfriamento por 14 dias adicionadas de 0,5% de extrato de erva-mate. Vale ressaltar que, no presente estudo, PI equivalente foi encontrado para a dosagem de 0,15EM, concentração bastante inferior à utilizada pelos autores, mas isso se deve à utilização de carne do peito nas almôndegas, que contém menores teores de lipídios em comparação à coxa e sobrecoxa.

A adição de extrato de erva-mate em outros tipos de produtos cárneos também se mostrou efetiva, promovendo a estabilidade oxidativa dos lipídios. Ferreira et al. (2011) avaliaram o efeito antioxidante da utilização de 0,01 e 0,10% do extrato de erva-mate em hambúrgueres de carne bovina durante o congelamento por 90 dias e verificaram que a concentração de 0,1% apresentou atividade antioxidante sem alterar as características sensoriais das carnes. Veeck et al. (2013) também verificaram que o extrato de erva-mate preveniu a oxidação lipídica, além de diminuir as mudanças na coloração de filés de dourado durante o congelamento por 12 meses, quando comparado com o controle negativo.

6. CONCLUSÃO

A adição de extrato de erva-mate foi eficiente para aumentar a estabilidade dos lipídios em almôndegas de carne do peito de frango nas condições deste estudo, independente da concentração. No entanto, as concentrações de 0,15 e 0,20% foram as mais eficazes no controle da oxidação lipídica desde o cozimento até o final do armazenamento refrigerado. Pode-se recomendar a dosagem de 0,18% como a mais eficiente no controle da oxidação lipídica neste estudo e também a realização de mais estudos para a avaliação complementar das características sensoriais deste produto cárneo a fim de avaliar aceitabilidade pelos consumidores. Em conclusão, a eficácia do extrato de erva-mate na diminuição da peroxidação lipídica nas condições deste estudo sugere que sua aplicação em produtos à base de carne de frango poderá ser uma alternativa para a substituição de antioxidantes sintéticos na conservação desses produtos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASOLINI, F. C., TEDESCO, A. M., CARPES, S. T., FERRAZ, C., ALENCAR, S. M. Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de Plantas Usadas como Chás. **Braz. J. Food Technol.**, v.9,p. 209-215, 2006.

BASTOS, D. H. M.; ISHIMOTO, E. Y.; MARQUES, M.O.M.,FERRI, A.F.; TORRES, E. A. F. S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.538–543, 2006.

BRACESCO, A., SANCHEZ, A.G., CONTRERAS, V., MENINI, T., GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378-384, 2011.

BERTÉ, K. A. S., BEUX, M. R., SPADA, P. K. W. D. S., SALVADOR, M., HOFFMANN-RIBANI, R. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Yerba-Mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) Extract as Obtained by Spray Drying. **J. Agric. Food Chem**, v. 59, p. 5523–5527, 2011.

BURRIS, K. P.; HIGGINBOTHAM, K. L.; STEWART, C. N., JR. Aqueous extracts of yerba mate as bactericidal agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a microbiological medium and ground beef mixtures. **Food Control**, v. 50, p.748-753, 2015.

CAMEL, M., BECEGATTO, M. G., VALDUGA, A. T., CICHOSKI, A. J., TONIAZZO, G.,VALDUGA, E., CANSIAN, R. L., OLIVEIRA, D. Influência do potencial antioxidante de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) em frango assado, armazenado e reaquecido.**Alim. Nutr.**, v. 23, p. 297-305, 2012.

CANTOR, A.H., DECKER E. A., COLLINS, V.P. Fatty acids in poultry and egg products. In: Chow C.K.,(Ed). **Fatty acids in foods and their health implications**. 3ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 127-154.

CERQUEIRA, F. M., MEDEIROS, M. H. G., AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30, p.441-449, 2007.

COLPO, A. Z. C. **Perfil fitoquímico e capacidade antioxidante de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St. Hill.)**. 2012, 102p. Dissertação de Mestrado em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2012.

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants. **Nutr. Rev.**, v. 55, p. 396-398, 1997.

FERREIRA, E. L. SAMPAIO, G. R.; TORRES, E. A. F. S.; BASTOS, D. H. M. Natural Antioxidant from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) Prevents Hamburger Peroxidation. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.54, p. 803-809, 2011.

FILIP R, LOPEZ P, GIBERTI G, COUSSIO J, FERRARO G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v.72, p.774–778, 2001.

GORDON, M.H. The development of oxidative rancidity in foods In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food : Practical applications** Cambridge : Woodhead Publishing, 2001. p. 7-21.

HECK, C.I., DE MEJÍA, E.G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of food Science**, v. 72, p.138-151, 2007.

KAHKONEN, M. P., HOPIA, A. I., VUORELA, H. J. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, p. 3954-3962, 1999.

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

LIMA JUNIOR, D. M., RANGEL, A. H. N., URBANO, S. A., MORENO, G. M. B. Oxidação lipídica e qualidade da carne ovina. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.1, p.14-28, 2013.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A., **Plantas Medicinais no Brasil, nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. 2 ed., 2008, p.90-91.

MADSEN, H.L., SØRENSEN, B., SKIBSTED, L.H., BERTELSEN, G. The antioxidative activity of summer savory (*Satureja hortensis* L) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) in dressing stored exposed to light or in darkness. **Food Chemmistry**, v. 63, p. 173-180, 1998.

MARIUTTI, L.R.B., BRAGAGNOLO, N. A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.68, p.1-11, 2009.

MATSUMOTO, R.L.T., BASTOS, D.H.M., MENDONÇA, S., NUNES, V.S., BARTCHEWSKY, W., RIBEIRO, M.L., CARVALHO, P.O. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes ,lipid peroxidation, and total antioxidants status in healthy young women. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, p.1775–1780, 2009.

MILANI, L. I. G., TERRA, N. N., FRIES, L. L. M., REZER, A. P. S., FERREIRA, S. F., CICHOSKI, A. J., VALENTE, C. R. F. Oxidação lipídica, características sensoriais e cor da carne de frango adicionada de extratos de caqui (*Diospyros kaki*, L.) e submetida a tratamento térmico. **Braz. J. Food Technol.**, v. 13, p. 242-250, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4ed. Sarvier: São Paulo:, 2006. 1202p.

NEPA - NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4ed. Editora UNICAMP: Campinas, SP, p. 16-104, 2011.

PAGLIOSA, C.M. **Caracterização química do resíduo de ervais e folhas “in natura” de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. 2009, 146p. Dissertação de Mestrado em Ciências dos Alimentos - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

POKORNÝ, J. Introduction In: POKORNÝ, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food : Practical applications** Inglaterra : Woodhead Publishing, 2001. p.3-5.

RACANICCI, A.M.C., DANIELSEN, B., MENTEN, J.F.M., REGITANO-D'ARCE, M.A.B., SKIBSTED, L.K. Antioxidant effect of dittany (*Origanum dictamnus*) in pre-cooked chicken meat balls during chill storage in comparison to rosemary (*Rosmarinus officinalis*), **Eur Food Res Technol.**, v.218, p. 521-524, 2004.

RACANICCI, A.M.C., DANIELSEN, B., SKIBSTED, L. H. Mate (*Ilex paraguariensis*) as a source of water extractable antioxidant for use in chicken meat. **Eur Food Res Technol.**, v.277, p. 255-260, 2008.

RAMALHO, V. C., JORGE, N. Atividade antioxidante do α -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.65, p.15-20, 2006.

RIBANI, R. H. **Compostos fenólicos em erva-mate e frutas**. 2006. 138p. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMEULA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SMET, K., RAES, K., HUYGHEBAERT, G.; HAAK, L.; ARNOUTS, S.; DE SMET, S. Lipid and Protein Oxidation of Broiler Meat as Influenced by Dietary Natural Antioxidant Supplementation. **Poultry Science**, v. 87, p. 1682-1688, 2008.

TANG, S., KERRY, J. P., SHEEHAN, D., BUCKLEY, D. J., MORRISSEY, P. A. Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. **Food Research International**, v.34, p. 651-657, 2001.

VEECK, A. P. L.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; EMANUELLI, T. Mate extract on lipid and color changes of dourado fillets during frozen storage. **Ciência Rural**, v.43, p.1317-1322, 2013.

CAPÍTULO 3

Atividade antimicrobiana do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) na microbiota da carne de peito de frango resfriada

1. RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano da adição de extratos de erva-mate em carne do peito de frangos resfriada e o efeito antimicrobiano *in vitro* frente a *E. coli* e ao *P. mirabilis* que foram isoladas da carne de peito de frango. As amostras de carne do peito de frango frescas foram obtidas em abatedouro comercial e divididas em cinco tratamentos com três repetições, sendo: controle negativo, sem extrato (CN), 0,05% (0,05EM), 0,10% (0,1EM), 0,15% (0,15EM) e 0,20% (0,2EM) de extrato de erva-mate. Durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7°C) foi efetuada a contagem de bactérias mesofílicas totais, psicotróficas e bolores e leveduras a cada dois dias e os resultados médios foram analisados utilizando os procedimentos do programa estatístico SAS. Duas bactérias isoladas de amostras de peito de frango foram identificadas pelos testes bioquímicos e submetidas ao teste de difusão em disco frente a diferentes concentrações de extrato (125mg/ml, 250mg/ml, 550mg/ml de extrato de erva mate, controle negativo com solução salina 0,85% e erva mate pura). No dia 1 a contagem de bactérias mesofílicas totais e psicotróficas foi reduzida significativamente ($P < 0,05$) à medida que a concentração do extrato aumentou. Já a contagem de bolores e leveduras resultou em regressões significativas nos dias 1 e 3, sendo que a contagem diminuiu de forma linear ($P < 0,05$) com o aumento da concentração do extrato no dia 1 e de forma quadrática ($P < 0,05$) no dia 3. No teste de difusão em disco foi verificado que com o aumento da concentração de mate aplicada, maior foi o halo de inibição formado ($P < 0,0001$), tanto para a *E. coli* quanto para o *P. mirabilis* e que o tratamento com erva-mate puro se mostrou o tratamento mais eficiente frente ambas as bactérias. A adição do extrato de erva mate mostrou atividade antimicrobiana ($P < 0,0001$) *in vitro* frente a bactérias presentes

em carnes de frango, porém não controlou o crescimento microbiano durante armazenamento refrigerado, quando adicionado diretamente às amostras de carne de peito de frango.

Palavras-Chave: Antimicrobiano natural, erva-mate, peito de frango, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*

Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) extract in the microbiota of chilled chicken breast meat

2. ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effect of the addition of yerba mate extract to chicken breast meat during chilled storage and the *in vitro* antimicrobial effect against *E. coli* and *P. mirabilis* isolated from chicken breast meat. The meat samples were divided into five treatments with three repetitions consisting of: negative control with no antimicrobial additive (NC), 0.05% (0,05EM), 0.1% (0,10EM), 0.15% (0,15EM) and 0.2% (0,20EM) yerba mate extract. The amount of total mesophilic bacteria, psychrotrophic, molds and yeasts was evaluated every two days during chilled storage (7°C) for 7 days and the averages were analyzed using the SAS program. Two bacteria isolated from chicken breast samples were identified by biochemical tests and submitted to the disc diffusion test using different extract concentrations (125mg/ml, 250mg/ml, 550mg/ml of yerba mate extract, negative control with 0.85% saline and pure mate). The total mesophilic and psychrotrophic bacteria was reduced ($P < 0.05$) with the increasing concentration of yerba mate extract on day 1 of storage. For molds and yeasts, increasing yerba mate addition reduced linearly ($P < 0.05$) the count on day 1 and quadratically ($P < 0.05$) on day 3. Increasing addition of yerba mate extract also increased ($P < 0.0001$) inhibition for *E. coli* and *P. mirabilis* and the treatment with pure yerba mate showed the most effective treatment against both bacteria. The yerba mate extract showed *in vitro* antimicrobial activity against the studied bacteria, however, did not exhibit microbial growth control when added to raw chicken breast meat during 7 days of chilled storage, not contributing to the extent of shelf life.

Keywords: Natural Antimicrobial, yerba mate, chicken breast, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*

3. INTRODUÇÃO

Grande parte dos alimentos possui quantidade suficiente de substratos para garantir o crescimento microbiano. A carne é um alimento bem propício a contaminação por microrganismos, uma vez que possui fatores intrínsecos como a atividade de água e a acidez, que favorecem o crescimento microbiano. O tempo de prateleira da carne refrigerada em aerobiose é considerado curto, cerca de uma ou duas semanas, e depende principalmente da contaminação inicial (Forsythe, 2002; Milani, 2012).

O tempo de prateleira de um produto depende de diversos fatores, sendo a presença de microrganismos um dos mais relevantes, o que justifica a importância de controles durante toda fase de produção, estocagem e manipulação dos alimentos (Pereira, 2009), uma vez que as carnes podem ser facilmente contaminadas durante o abate ou no processo de produção (Krishnan et al., 2014).

O consumo de carne de frango vem se destacando como uma importante fonte de proteína animal e por ser um produto saudável e de baixo custo. Por isso, a qualidade microbiológica desses produtos tem grande importância para a saúde pública (Penteado & Esmerino, 2011). A carne de frango recebe atenção quanto a contaminação microbiana, uma vez que está relacionada ao desenvolvimento de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) por meio da veiculação de bactérias patogênicas (Carvalho et al., 2005). São frequentemente isoladas as bactérias patogênicas como a *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, responsáveis por causar danos à saúde dos consumidores. Além das bactérias patogênicas, podem-se encontrar bactérias deteriorantes, sendo as *Pseudomonas* usualmente encontradas em carnes de aves (Spoto et al., 1999).

Por muitos anos as plantas têm sido usadas como fonte de compostos bioativos, uma vez que desenvolveram mecanismos de defesa naturais contra o ataque por diversos patógenos. Com o aumento da demanda por alimentos produzidos de forma mais natural, os

pesquisadores estão estudando a utilização de plantas e seus compostos bioativos para diversas aplicações comerciais, no intuito de eliminar ou reduzir as bactérias patogênicas e deteriorantes (Burriss, 2011).

Pesquisas envolvendo a atividade antimicrobiana de extratos de plantas populares contra microrganismos em alimentos apresentam cada vez maior relevância e interesse em detrimento ao uso de antimicrobianos sintéticos. Além disso, várias bactérias desenvolveram resistência a certos antibióticos, desta forma, outras fontes de agentes antimicrobianos são necessárias (Burriss, 2011; Ibrahim et al., 2011; Milani, 2012; Kim et al., 2013; Burriss et al., 2015).

A *Ilex paraguariensis*, popularmente conhecida como erva mate é produzida e comercializada principalmente no Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina (Bracesco et al., 2011). Os principais constituintes encontrados nessa planta são os compostos fenólicos, as xantinas e as saponinas, entretanto é difícil esclarecer quais compostos e suas combinações que são mais relevantes para a atividade antimicrobiana (Burriss et al., 2012). Os extratos obtidos a partir da *Ilex paraguariensis* vem mostrando forte efeito antimicrobiano *in vitro* (Bona et al., 2010) e quando adicionados nos alimentos (Burriss et al., 2015). Porém, a utilização da erva mate como antimicrobiano natural para a conservação de alimentos ainda é um novo conceito que ainda não foi amplamente estudado e revisado (Burriss et al., 2012).

Com base nos poucos estudos referentes a utilização da erva-mate em carnes, este trabalho teve por objetivo investigar o efeito da adição de diferentes concentrações de extrato de erva-mate sobre a inibição de microrganismos em carne do peito de frango cruas e armazenadas sob resfriamento para a determinação da melhor concentração desse extrato para a promoção de um maior tempo de prateleira. Além disso, investigar o efeito inibidor da adição de diferentes concentrações do extrato de erva-mate sobre duas bactérias isoladas que podem ser encontradas na carne de frango.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Avaliação microbiológica do extrato de erva-mate

O extrato de EM a ser utilizado foi submetido a análise para avaliação da sua condição microbiológica. Para isso, foi realizada a mensuração em triplicata em 25g da amostra do número mais provável (NMP) de coliformes totais e coliformes termotolerantes, a contagem padrão de bactérias mesofílicas totais, a contagem de bactérias psicotróficas, a contagem de bolores e leveduras e a pesquisa da presença de *Staphylococcus sp.* e de *Salmonella sp* segundo o protocolo recomendado por Silva et al. (2010) e as normas presentes na Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura pecuária e Abastecimento (MAPA).

4.2. Coleta da carne do peito de frango e preparo das amostras

A carne do peito de frangos foi obtida diretamente de um abatedouro comercial do Distrito Federal com fiscalização do Serviço de Inspeção Federal (SIF), cuja desossa foi realizada mecanicamente. Logo após o abate, as carcaças de frango passaram por todos os processos rotineiros de um abatedouro de aves conforme a portaria 210 de 10 de novembro de 1998 instituída pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. As amostras de carne de peito doadas para a realização do presente trabalho foram recebidas na embalagem original da empresa, contendo cerca de dois a três peitos de frangos por pacote. As amostras foram acondicionadas em caixa de isotérmica e levadas ao Laboratório de Microbiologia e Análise de Alimentos (LAMAL) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da

Universidade de Brasília (UnB), onde foram armazenadas sob resfriamento (7°C) até a hora do preparo.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana da erva-mate nas amostras de peito de frango, foram utilizados 15 peitos inteiros acondicionados individualmente em embalagem estéril e divididos em cinco tratamentos com três repetições por tratamento. Os tratamentos utilizados foram: controle negativo- sem extrato (CN), 0,05% (0,05EM), 0,10% (0,1EM), 0,15% (0,15EM) e 0,20% (0,2EM) de extrato de erva-mate. O extrato liofilizado, em pó foi pesado de forma estéril, adicionado ao peito de frango e posteriormente homogeneizado para sua melhor distribuição. Foi estabelecido como dia 0, o primeiro dia do experimento em que foi realizado o preparo das amostras de peito e a adição do extrato, a partir do dia 1 foram iniciadas as avaliações das análises microbiológicas.

Para a verificação do perfil de crescimento microbiano foram estabelecidas como parâmetros: a contagem de bactérias mesofílicas totais, de bactéria psicotróficas e bolores e leveduras, que foram realizadas a cada 2 dias até o dia 7, sendo que no dia 1, além dessas contagens, foi realizado a avaliação da presença dos microrganismos patogênicos *Staphylococcus sp.* e de *Salmonella sp.* e a mensuração do número mais provável de coliformes totais e termotolerantes. A contagem de bactérias psicotróficas foi realizada somente nos dias 1, 3 e 7, pois as amostras do dia 5 foram perdidas. As amostras de carne de peito de frango foram armazenadas em sob resfriamento com temperatura de 7°C, sem contato com qualquer outro produto.

4.3. Contagem de bactérias mesofílicas totais

A contagem de bactérias mesofílicas foi realizada conforme Silva et al., (2010) e a Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003 do MAPA. Para cada dia de análise, foi utilizado $25\text{g} \pm 0,2\text{ g}$ de amostra obtida cortando aleatoriamente a carne do peito de frango. As amostras foram homogeneizadas em 225mL de solução salina 0,85% obtendo-se a diluição 10^{-1} , sendo necessário utilizar a diluição de 10^{-5} no último dia de análise. A homogeneização da diluição foi realizada com o auxílio do “stomacher”. Cerca de 1ml da diluição foi colocada em placa de Petri e adicionado 15 a 20ml de ágar padrão para contagem (PCA) fundido e mantido em temperatura de cerca de 45 °C. Posteriormente, foi realizado a homogeneização do ágar com o inóculo, deixando solidificar o conjunto em superfície plana e, por fim, foi

realizada a incubação das placas semeadas invertidas em estufa com temperatura de 37 (\pm 1°C) por 48 horas. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g).

4.4. Contagem de bactérias psicotróficas

A contagem de psicotróficos foi realizada conforme Silva et al., (2010). Para cada dia de análise, foram utilizadas 25g (\pm 0,2g) de amostra obtidas cortando aleatoriamente a carne do peito de frango. As amostras foram homogeneizadas em 225 mL de solução salina 0,85% obtendo-se a diluição 10^{-1} , sendo necessário utilizar a diluição de 10^{-5} no último dia de análise. A homogeneização da diluição foi realizada com o auxílio do “stomacher”. Cerca de 1ml da diluição foi semeado em superfície em placa de Petri contendo 15 a 20ml de ágar padrão para contagem (PCA) já solidificado. Por fim, foi realizada a incubação das placas semeadas invertidas em temperatura de $7 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 dias. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g).

4.5. Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi realizada conforme Silva et al. (2010) e a Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003 do MAPA. Foram utilizados 25g (\pm 0,2 g) de amostra obtidos cortando aleatoriamente a carne do peito. As amostras foram diluídas em 225 mL de solução salina 0,85% obtendo-se a diluição 10^{-1} , sendo necessário utilizar a diluição de 10^{-3} no último dia de análise. A homogeneização da diluição foi realizada com o auxílio do “stomacher”.

Uma vez que a análise baseia-se na verificação da capacidade desses microrganismos de se desenvolverem em meios de cultura com pH próximo a 3,5, sendo que esse pH promove o crescimento seletivo de fungos inibindo grande parte das bactérias encontradas em alimento, utilizou-se o ágar batata glicose 2% e o ácido tartárico 10% na proporção de 1,5ml para cada

100ml de meio, obtendo-se um pH de 3,5. 0,1ml da diluição da amostra foi inoculado em placa de Petri e adicionado 15 a 20ml de ágar batata glicose 2% fundido e mantido em temperatura de cerca de 45 °C e o ácido tartárico.

e espalhado por toda a superfície do meio, até sua total absorção. Foi realizada a incubação das placas semeadas em temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 dias. Os resultados foram expressos em UFC/g.

4.6. Pesquisa de *Staphylococcus sp.*

A avaliação da presença de *Staphylococcus sp.* foi realizada conforme metodologia descrita por Silva et al. (2010) e a Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003 do MAPA. Nessa análise, 0,1ml da diluição da amostra foi inoculada e distribuída uniformemente em ágar Baird-Parker na presença de telurito de potássio e gema de ovo solidificado. A gema de ovo possibilita a verificação das atividades proteolítica e lipolítica do *Staphylococcus aureus* por meio do aparecimento de um halo transparente e um de precipitação ao redor da colônia, respectivamente. Além disso, o *S. aureus* reduz o telurito de potássio produzindo colônias enegrecidas. As placas invertidas foram incubadas a $37 (\pm 1^\circ\text{C})$ por 48 horas. Os resultados foram expressos como Presença/25g ou Ausência/25g.

4.7. Pesquisa de *Salmonella sp.*

A avaliação da presença de *Salmonella sp.* foi realizada conforme Silva et al. (2010) e a Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003 do MAPA. Para essa análise, 25 ($\pm 0,2$)g de cada repetição foram submetidos: ao pré-enriquecimento em solução peptonada tamponada 1% a $37 (\pm 1^\circ\text{C})$ por 24 horas; ao enriquecimento com o caldo Rappaport Vassiliadis e caldo Selenito-Cistina incubados a 42°C por 24 horas e ao isolamento e seleção com a utilização do ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS) incubado com a placa invertida a 37°C por 24 horas. Os resultados foram expressos como Presença/25g ou Ausência/25g.

4.8. Número mais provável de coliformes totais e termotolerantes

A obtenção do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes foram realizadas conforme Silva et al. (2010) e a Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003 do MAPA. Consistiu da inoculação de 1ml da amostra homogeneizada em solução salina peptonada 0,1%, em triplicata, em caldo Lauril sulfato de sódio em 3 diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e incubado a $37 (\pm 1^\circ\text{C})$ por 48 horas, na qual a presença de coliformes é evidenciada pela turvação e/ou formação de gás nos tubos de Durhan. Essa produção de gás ocorre devido à fermentação da lactose contida no meio. 0,1ml do inóculo de cada tubo em que houve fermentação no caldo Lauril sulfato de sódio foi inoculado, para prova confirmativa de coliformes totais em caldo verde brilhante bile lactose 2% e posterior incubação a $35 (\pm 1^\circ\text{C})$ por 48 horas e, para prova confirmativa de coliformes termotolerantes em caldo *Escherichia coli* (EC), com incubação em temperatura de $45 (\pm 0,2^\circ\text{C})$ por 48 horas. A presença de gás nos tubos de Durhan nos caldos verde brilhante bile lactose 2% e EC evidenciam a fermentação da lactose presente no meio. Os três caldos presentes nessa análise são seletivos devido às suas capacidades de inibição do crescimento de microrganismos Gram-positivos. O resultado foi fornecido a partir da combinação de números correspondentes aos tubos positivos em cada teste confirmatório utilizando-se a tabela de NMP, o resultado foi expresso em NMP/g.

4.9. Isolamento microbiano da carne de peito de frango

Com o intuito de isolar dois microrganismos da carne de frango, inicialmente utilizou-se 0,1ml do inóculo obtido na análise do NMP de coliformes termotolerantes positivos em caldo EC. Este inóculo foi semeado em placa de ágar MacConkey e, posteriormente, em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB). Uma colônia verde brilhante foi repicada em ágar EMB para melhor isolamento e, posteriormente, inoculada em ágar nutriente para a identificação pelos testes de catalase, oxidase, coloração de Gram, bioquímicos e sorológico. Após todos os testes, foi identificada a *Escherichia coli*.

Das análises de pesquisa de *Salmonella sp.*, foi feito a seleção de uma colônia do ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS) após incubação a 37°C por 24 horas. Esta colônia retirada do ágar BPLS foi inoculada em placa de ágar MacConkey e algumas colônias que cresceram neste meio de cultura formando um véu foram então selecionadas e repicadas em ágar nutriente para a identificação pelos testes de catalase, oxidase, coloração de Gram e bioquímicos. Após todos os testes, foi identificado o *Proteus mirabilis*.

4.9.1. Testes bioquímicos utilizados para identificação bacteriana

Os testes bioquímicos utilizados para identificação das bactérias foram: Indol, VM/VP, citrato, ágar ferro três açúcares (TSI), motilidade, ágar fenilalanina, uréia, maltose, sacarose, glicose, lactose, manose, manitol e ornitina conforme descrito por Oliveira (2000).

4.9.2. Teste sorológico

Foram utilizados os soros polivalentes A, B e C anti-E. coli enteropatogênica clássica (marca Probac do Brasil). Para tal análise foi realizada a técnica de aglutinação em lâmina, conforme recomendado pelo fabricante. Houve aglutinação quando o inóculo foi exposto ao soro polivalente B.

4.10. Preparação dos discos com as diferentes concentração de erva-mate e do Inóculo

Um total de seis discos para cada tratamento foi preparado utilizando-se papel filtro (marca Framex) com 6mm de diâmetro, que foram cortados e autoclavados para garantia da esterilidade. Os tratamentos utilizados foram: controle negativo (solução salina 0,85%),

adição de 125mg/ml, 250mg/ml, 550mg/ml de extrato de EM, e extrato de EM puro. As concentrações utilizadas nos diferentes tratamentos foram obtidas pela diluição do extrato em solução salina 0,85% e homogeneizadas com de um agitador de tubos tipo Vortex.

Cada disco recebeu 10µl dos diferentes tratamentos, sendo que no tratamento com extrato de EM puro, o disco foi umedecido em solução salina 0,85% e envolto pelo extrato em forma de pó. Cada tratamento foi realizado em triplicata e os discos foram incubados a 36 (\pm 1°C) por 36 horas para secagem e armazenados lacrados a 7 °C até o dia das análises (De Biasi et al., 2009; Carelli et al., 2011; Milani et al., 2012).

Para preparação do inóculo, foram selecionadas três colônias de *Proteus mirabilis* e uma colônia de *Escherichia coli* e depositadas em solução salina 0,85%. Incubou-se a 35° C até alcançar ou exceder a turbidez de 0,5 da solução padrão de McFarland, conforme as recomendações presentes no manual de padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão que segue as recomendações do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003).

4.11. Teste de difusão em disco

Com o auxílio de *swab* estéril, o inóculo foi semeado de forma uniforme por toda a superfície, inclusive nas margens da placa de ágar Müeller-Hinton.. Foram adicionados 3 a 4 discos em cada placa semeada. As placas semeadas e contendo os discos foram invertidas e incubadas a 36 (\pm 1°C) por cerca de 18 horas. Os diâmetros dos halos de inibição total foram mensurados em milímetros utilizando-se uma régua, incluindo o diâmetro do disco. O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento detectável a olho nu. O resultado final de cada tratamento foi dado em milímetros (mm) e foi obtido pela média das 3 repetições. Foi considerado suscetível, halos com diâmetro igual ou acima de 10 mm (NCCLS, 2003).

4.12. Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com um controle negativo e quatro concentrações de extrato, totalizando cinco tratamentos experimentais. As análises foram realizadas em triplicata a cada tratamento e dia de análise.

Todos os dados foram submetidos a análise de variância (GLM) utilizando software estatístico SAS[®] (SAS 5.1). Os dados de contagem de bactérias mesofílicas totais, psicotróficos e bolores e leveduras por dia de análise, assim como os dados do halo de inibição submetidos às diferentes concentrações de EM, para as duas bactérias analisadas, foram submetidos à análise de regressão por meio do PROC REG do software estatístico SAS 5.1. As diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey, com o nível de significância de 5% na comparação entre todos os tratamentos no teste de difusão em disco.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação microbiológica do extrato de erva-mate e da condição microbiológica da carne no dia 1

A análise microbiológica na qual o extrato de EM foi submetido revelou ausência de crescimento de bactérias mesofílicas totais, de bolores e leveduras e de psicotróficos. Não houve crescimento de *Salmonella sp* e de *Staphylococcus sp*, 25g de amostra e não houve turvação ou formação de gás em caldo lauril sulfato de sódio para a avaliação de coliformes totais. Após essas avaliações, concluiu-se que o extrato de EM estava livre de contaminação bacteriana e fúngica nas análises avaliadas, sendo considerado apropriado para a continuidade dos estudos.

Nas análises microbiológicas realizadas no primeiro dia nas amostras de peito de frango submetidos às diferentes concentrações de EM foi possível observar ausência de *Salmonella sp* e de *Staphylococcus sp* em todas as amostras. Apesar de não ter sido detectada a presença de *Staphylococcus aureus*, sabe-se que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* promove atividade antibacteriana frente a esta bactéria em carne bovina moída mesmos em concentrações relativamente baixas (2 a 32mg/ml), segundo Burris et al. (2015), indicando potencial para uso como antimicrobiano natural em alimentos de origem animal. Entretanto, no mesmo dia de análise, foi constatada a presença de NMP de coliformes 35°C e 45°C em todas os tratamentos avaliados (Tabela 4). Apesar disso, todas as amostras estão de acordo com o exigido pela legislação brasileira, segundo a RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, uma vez que apresentaram quantidades de coliformes (a 45°C) inferiores a 10⁴ NMP/g de amostra.

Tabela 4- Resultados de NMP de coliformes (NMP/g de amostra) em peito de frango contendo os tratamentos controle negativo, sem adição de extrato de erva-mate (EM)- CN; adição de 0,05% de EM (0,05EM); adição de 0,10% de EM (0,10EM); adição de 0,15% de EM (0,15EM) e adição de 0,20% de EM (0,20EM), analisados no dia 1.

Tratam.	Coliformes (45°C)			Coliformes (35°C)		
CN	<3	<3	23	1100	28	15
0,05EM	7	460	460	460	460	460
0,10EM	93	9	15	93	4	43
0,15EM	39	<3	4	75	7	150
0,20EM	4	9	<3	4	21	23

A presença de NMP de coliformes totais indica falha nas práticas de higienização dos produtos, geralmente após o processamento. Já a presença de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes pode ser interpretada como indicador de contaminação por patógenos de origem entérica, revelando também condições higiênico-sanitárias insatisfatórias (Cardoso et al., 2005; Penteadó & Esmerino, 2011). Neste estudo, foi possível observar que a adição de 0,20% de EM apresentou os menores valores obtidos no dia 1. Já nas amostras do controle negativo (CN) e de 0,05EM foram verificados os maiores valores na contagem de coliformes a 35°C, possivelmente devido a ausência ou a baixa concentração do extrato. Esse fato pode contribuir para a diminuição do tempo de prateleira, já que, segundo Forsythe (2002), quanto maior a carga de flora microbiana inicial, menor a vida de prateleira devido ao aumento da atividade microbiana.

5.2. Contagens de bactérias e fungos nos peitos de frango durante o armazenamento

O resultado para a contagem de bactérias mesofílicas totais nos dias um, três, cinco e sete para as diferentes concentrações do extrato de EM em peitos de frango estão demonstrados na Tabela 5. Essa contagem é usada como indicador de qualidade higiênica dos alimentos e, quando em grande número, indica falhas durante a produção (Cardoso et al., 2005).

Tabela 5 - Média das contagem de bactérias mesofílicas totais (UFC/g) em peitos de frango adicionados de diferentes concentrações de extrato de erva-mate (EM) durante o armazenamento resfriado.

Tratam.	Armazenamento (dias)			
	1	3	5	7
CN	$3,39 \times 10^4$	$6,47 \times 10^4$	$2,50 \times 10^6$	$5,45 \times 10^7$
0,05EM	$2,06 \times 10^4$	$8,47 \times 10^4$	$1,97 \times 10^6$	$7,54 \times 10^7$
0,10EM	$1,24 \times 10^4$	$5,10 \times 10^4$	$2,89 \times 10^6$	$9,52 \times 10^7$
0,15EM	$1,07 \times 10^4$	$1,15 \times 10^4$	$2,97 \times 10^6$	$6,60 \times 10^7$
0,20EM	$5,97 \times 10^3$	$1,01 \times 10^4$	$1,65 \times 10^6$	$1,62 \times 10^7$
CV	50,02	70,59	37,79	51,38
P	0,0162 ¹	0,0565	0,3642	0,1012

CV: Coeficiente de variação (%)

$$Y^1 = 29853 - 13,14667x / R^2 = 0,6061$$

No dia 1 foi possível observar uma regressão linear (Gráfico 3.1), em que quanto maior a concentração do extrato, menor foi a contagem de bactérias mesofílicas totais. Porém, não foi possível observar regressão com significância até 5% nos demais dias de análise.

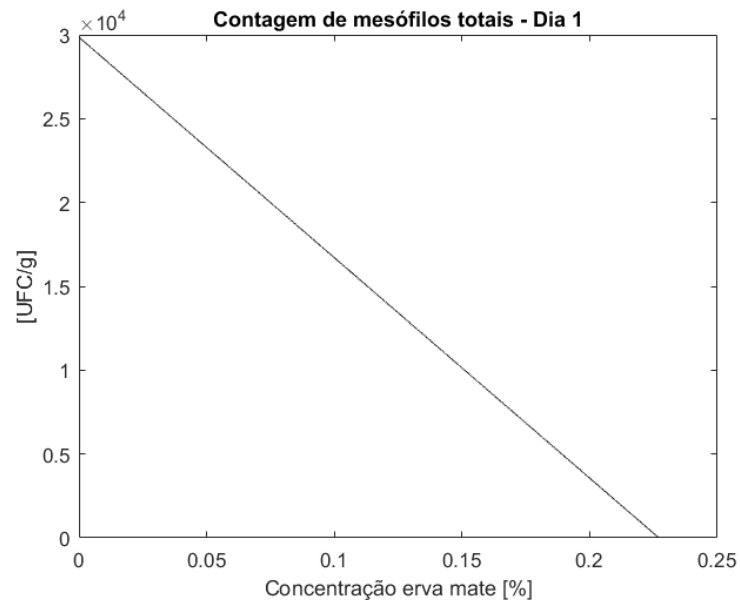


Gráfico 3.1 – Representação da regressão linear da contagem de bactérias mesofílicas totais (UFC/g) no dia 1 em amostras de peito de frango adicionados do extrato de erva-mate (EM).

Apesar da contaminação inicial ter sido controlada com o aumento da concentração do extrato, com o passar dos dias foi possível observar que não houve mais diferença significativa entre os tratamentos utilizados. Sendo assim, mesmo adicionadas as maiores concentrações, o extrato de EM não controlou o crescimento microbiano de bactérias mesofílicas viáveis, não contribuindo na extensão do tempo de prateleira.

A legislação brasileira (RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001) não regula o número máximo de bactérias mesofílicas totais que podem ser encontrados em carnes de frango, porém para Forsythe (2002), o limite microbiológico sugerido para contagem de bactérias mesofílicas totais para a determinação da vida de prateleira em carnes cruas é de 1×10^6 UFC/g. Diante das contagens sugeridas por esse autor, a carne utilizada no presente trabalho se enquadra dentro dos parâmetro de aceitabilidade mesmo antes dos 5 dias de armazenamento resfriado, a partir de então sendo considerada imprópria para o consumo.

Carvalho et al. (2005) utilizaram diversas amostras de produtos à base frango obtidas em estabelecimentos comerciais para avaliação da qualidade microbiológica destes produtos, uma vez que produtos de origem avícola são considerados veiculadores de bactérias patogênicas. Foi verificado que a contagem de bactérias mesofílicas sem coxas/sobrecoxas variou de $1,9 \times 10^4$ até $9,1 \times 10^4$ UFC/g de amostra. Essa contagem foi similar à encontrada nesse trabalho considerando até 3 dias de armazenamento.

Assim como no presente trabalho, Pereira et al. (2009) não encontraram bons resultados da EM na contagem de bactérias mesofílicas totais em carne mecanicamente separada (CMS) de frango mantida sob refrigeração de 0 a 4°C durante 10 dias. Além da erva-mate, os autores avaliaram a utilização de extratos de marcela (*Achyrocline satureioides*), própolis e chá verde como antimicrobianos naturais, tendo as amostras tratadas com EM apresentado as maiores contagens. Entretanto, ao associar o extrato de EM com o de marcela, por exemplo, ocorreu um sinergismo reduzindo a contagem de bactérias mesofílicas a valores inferiores àquelas apresentadas por cada planta individualmente. A contagem de bactérias mesofílicas totais aos 10 dias foi de $5,662 \pm 0,983 \text{Log}_{10}$ UFC/g amostra, que equivale a $4,5 \times 10^5$ UFC/g, inferiores às apresentadas por esse trabalho (Tabela 5). As contagens mais elevadas encontradas neste trabalho podem ter ocorrido devido à temperatura de armazenamento das amostras terem sido superiores, favorecendo assim o desenvolvimento das bactérias mesofílicas. Da mesma forma, Krishnan et al. (2014) analisaram o efeito antimicrobiano de alguns extratos de especiarias em peitos de frango crus durante o armazenamento sobre a contagem de bactérias mesofílicas totais e verificaram que as contagens foram significativamente ($P < 0,05$) menores na presença dos extratos e que a

utilização em conjunto de dois ou mais extratos também foi mais eficaz no controle de microrganismos.

O resultado para contagem de psicotróficos totais durante o armazenamento refrigerado para as diferentes concentrações do extrato de EM nas amostras estudadas estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Média das contagem de bactérias psicotróficas (UFC/g) em peitos de frango adicionados de diferentes concentrações de erva-mate (EM) durante o armazenamento resfriado

Tratam.	Armazenamento (dias)		
	1	3	7
CN	$7,87 \times 10^3$	$7,53 \times 10^3$	$3,72 \times 10^7$
0,05EM	$4,23 \times 10^3$	$2,23 \times 10^5$	$4,66 \times 10^7$
0,10EM	$8,33 \times 10^2$	$1,39 \times 10^5$	$5,05 \times 10^7$
0,15EM	$1,47 \times 10^3$	$2,26 \times 10^4$	$5,46 \times 10^7$
0,20EM	$1,17 \times 10^3$	$4,53 \times 10^3$	$2,99 \times 10^7$
CV	55,29	127,32	44,49
P	0,002 ¹	0,221	0,552

CV: Coeficiente de variação (%)

$$Y^1 = 7875,23810 - 9,34762x + 0,00306x^2 / R^2 = 0,7554$$

Assim como na contagem de bactérias mesofílicas totais, só foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos no primeiro dia de armazenamento. Todavia, os dados se enquadraram em uma regressão de segundo grau, em que a parábola apresentou concavidade voltada para cima e o ponto de inflexão de 0,15% de extrato de erva mate (Gráfico 3.2). Isso significa que, até atingir a concentração do ponto de inflexão, quanto maior a concentração do extrato, menor a contagem de psicotróficos.

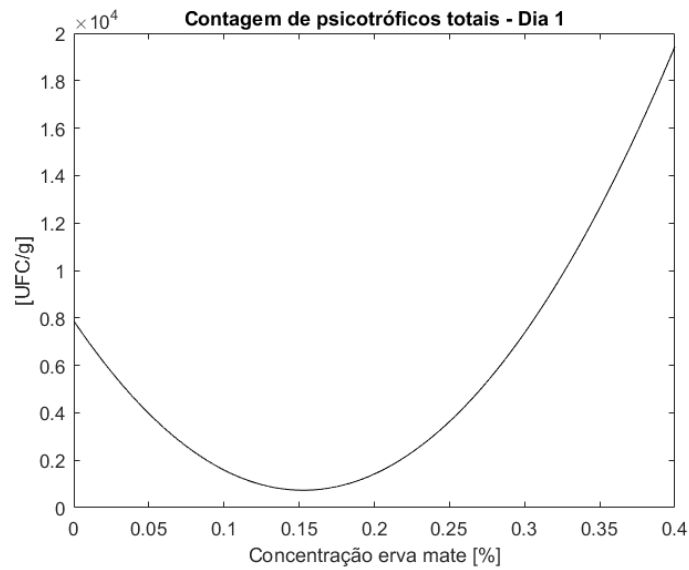


Gráfico 3.2 - Representação da regressão quadrática da contagem de bactérias psicotróficas totais (UFC/g) no dia 1 em amostras de peito de frango adicionados do extrato de erva-mate (EM).

Assim com na análise de bactérias mesofílicas totais, os valores encontrados para a contagem de bactérias psicotróficas neste trabalho até três dias de armazenamento são similares aos descritos por Carvalho et al. (2005) nas amostra de coxa/sobrecoxa de frango, variando de $7,1 \times 10^3$ até $1,3 \times 10^6$ UFC/g.

As bactérias psicotróficas predominam nas carcaças animais e possuem a capacidade de se multiplicarem em ambientes com temperaturas iguais ou inferiores a 0°C e, conseqüentemente, são indicados como os grandes responsáveis pelas alterações dos produtos refrigerados (Vieira & Teixeira, 1997). Assim, a vida de prateleira da carne de aves depende não só da temperatura de refrigeração adequada, mas também do número de microrganismos presentes na amostra durante a sua obtenção.

O resultado para a contagem de bolores e leveduras para os diferentes tratamentos aplicados nas amostras de peito de frango resfriado estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Média das contagem de bolores e leveduras (UFC/g) em peitos de frango adicionados de diferentes concentrações de erva-mate (EM) durante o armazenamento resfriado

Tratam.	Armazenamento (dias)			
	1	3	5	7
CN	$2,93 \times 10^3$	$1,24 \times 10^4$	$5,57 \times 10^4$	$1,95 \times 10^6$
0,05EM	$4,33 \times 10^3$	$1,31 \times 10^4$	$8,67 \times 10^4$	$2,62 \times 10^6$
0,10EM	$1,33 \times 10^3$	$1,45 \times 10^4$	$9,59 \times 10^4$	$1,88 \times 10^6$
0,15EM	$3,00 \times 10^2$	$4,30 \times 10^3$	$1,08 \times 10^5$	$1,74 \times 10^6$
0,20EM	$4,67 \times 10^2$	$1,73 \times 10^3$	$1,77 \times 10^4$	$3,69 \times 10^5$
CV	54,87	56,77	108,67	54,66
P	0,0031	0,04362	0,6495	0,1271

CV: Coeficiente de variação (%)

$Y^1 = 3666,66667 - 1,79333x / R^2 = 0,5206$

$Y^2 = 13971 - 0,00318x^2 / R^2 = 0,491$

Na contagem de bolores e leveduras foi possível identificar duas regressões significativas. No primeiro dia, a contagem diminuiu linearmente com o aumento da concentração do extrato de erva mate (Gráfico 3.3). Já no dia 3, os dados se enquadraram em uma regressão de segundo grau, resultando na formação de uma parábola com a concavidade voltada para baixo, sendo que o ponto de inflexão foi 0mg/kg (Gráfico 3.4), isto é, quanto maior a concentração do extrato de EM, menor a contagem de bolores e leveduras nesses dois dias.

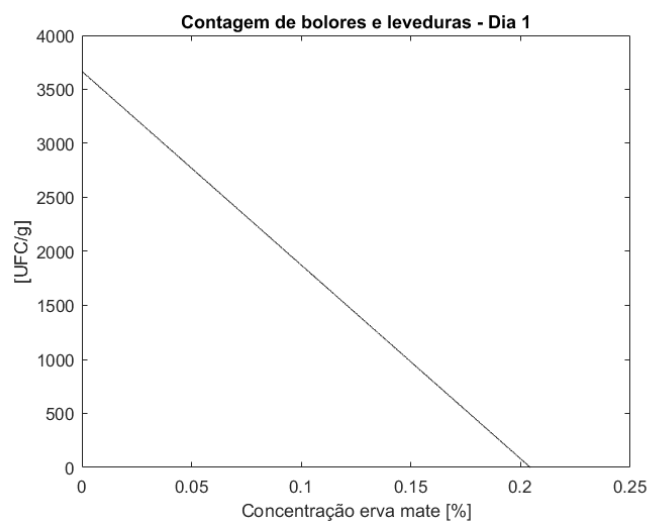


Gráfico 3.3 - Representação da regressão linear da contagem de Bolores e Leveduras (UFC/g) no dia 1 em amostras de peito de frango adicionadas do extrato de erva-mate (EM).

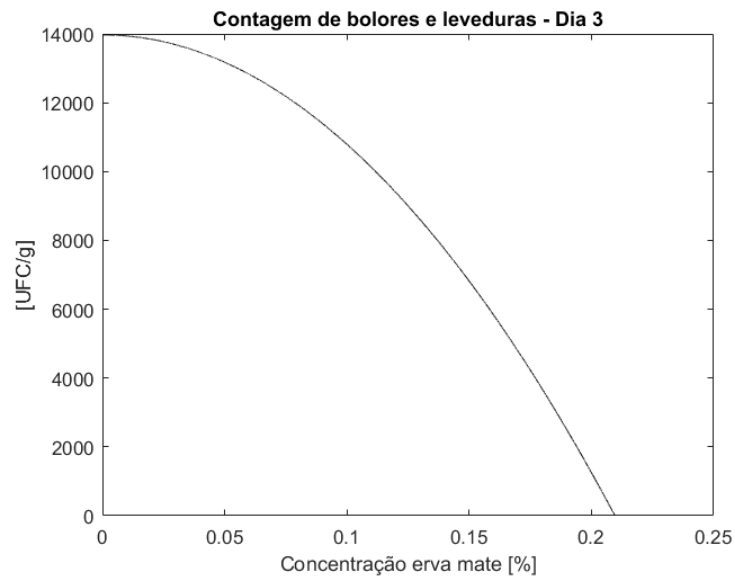


Gráfico 3.4 - Representação da regressão quadrática da contagem de Bolores e Leveduras (UFC/g) no dia 3 em amostras de peito de frango adicionadas do extrato de erva-mate (EM).

Apesar da atividade antimicrobiana de extratos de origem vegetal estar ligada à presença dos flavonóides e fenóis totais, extratos apresentando quantidades adequadas desses compostos podem não apresentar atividade antimicrobiana, sem inibir o crescimento de bactérias e fungos. Este fato pode ocorrer quando os compostos bioativos responsáveis pela atividade antimicrobiana não estão presentes em quantidade suficiente e necessária para a ação antimicrobiana esperada (Oliveira et al., 2012). Da mesma maneira, é possível que os compostos bioativos da erva-mate utilizada no presente trabalho, não estivessem presentes em quantidade suficiente para causar efeito bactericida ou bacteriostático esperado, considerando o ambiente rico em nutrientes que favorece a multiplicação microbiana, como é a carne de frango.

Como no trabalho de Milani (2012), em que amostras de peito de frango cruas armazenadas refrigeradas apresentaram curta vida de prateleira, revelando odores e características desagradáveis indicativas de deterioração microbiana após armazenamento por sete dias, as amostras do presente trabalho também já demonstravam alterações nos seus atributos sensoriais após o mesmo período de armazenamento refrigerado.

Foi possível observar que nos primeiros dias de armazenamento as maiores concentrações de EM obtiveram menores contagens bacterianas e fúngicas e a partir de 5 dias de armazenamento já não foi possível verificar diferença significativa entre os diferentes tratamentos, esse efeito pode ter ocorrido pois inicialmente os microrganismos presentes na carne estavam na fase LAG, adaptando-se aos antimicrobianos do extrato de EM, uma vez

superado esse desafio e adaptados ao meio, os microrganismos multiplicam-se sem demonstrar diferença significativa entre as contagens na carne sem ou com extrato.

Uma vez que a atividade antimicrobiana das diferentes concentrações de erva-mate utilizadas nesse trabalho frente às bactérias mesofílicas totais, as bactérias psicotróficas e aos bolores e leveduras em peitos de frangos foi somente suficiente para inibir o crescimento microbiano até do terceiro ou quinto dia de armazenamento resfriado, seria interessante a associação deste extrato com outro tipo de extrato vegetal para ampliar esse efeito antimicrobiano com um potencial efeito sinérgico, além da utilização de um método físico de controle de microrganismos como temperaturas mais baixas para a melhor preservação desse tipo de alimento.

5.3. Teste de difusão em disco

Os resultados da atividade antimicrobiana do extrato de EM nas diferentes concentrações frente à *Escherichia. coli* e ao *Proteus mirabiis* isolados de peitos de frango estão expostos na Tabela 8.

Tabela 8– Resultados médios da atividade antimicrobiana das diferentes concentrações de extrato de erva-mate (EM) frente à *E. coli* e ao *P. mirabiis*

Concentração do Mate (mg/ml)	Halo de inibição (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>
CN	0 ^D	0 ^D
125	10,99 ^C	20,21 ^C
250	12,44 ^{BC}	22,33 ^{BC}
550	13,99 ^{AB}	23,88 ^B
Puro	14,99 ^A	27,77 ^A
P	<0,0001 ¹	<0,0001 ²
CV	6,5	5,64

CV: Coeficiente de variação (%)

^{A,B,C} Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey (P<0,05).

$Y^1 = 0,81699 + 0,07656x - 0,00009630x^2 / R^2 = 0,9312$

$Y^2 = 1,55042 + 0,13997x - 0,00018191x^2 / R^2 = 0,9228$

Foi possível verificar diferença significativa entre as médias dos halos de inibição pelo teste de Tukey (P<0,05) entre os diferentes tratamentos, sendo que em ambas as

bactérias avaliadas, quanto maior a concentração do extrato de erva-mate aplicado, maior o halo de inibição obtido (Tabela 8).

Assim como no presente trabalho, Kim et al. (2013) também avaliaram o efeito antimicrobiano de extratos vegetais (*Pimpinella brachycarpa* e *Aralia elata*) *in vitro* e em carnes. Da mesma maneira, os extratos testados apresentaram resultados antimicrobianos *in vitro* sobre diversos microrganismos, porém não houve diferença significativa no final do experimento entre as amostras com ou sem extratos sobre bactérias mesofílicas totais e fungos.

Os halos de inibição formados devido a ação do extrato de EM para *P. mirabilis* foram superiores aos encontrados para *E. coli*, todavia foi possível notar que mesmo a menor concentração de extrato demonstrou atividade frente as duas bactérias. Assim como no presente trabalho, Vaquero et al. (2010) e Burris et al. (2011) também observaram efeito antimicrobiano dos extratos de *Ilex paraguariensis* frente a *Escherichia coli*.

Diferentemente do encontrado no presente trabalho, o extrato hidro-alcóolico de EM na concentração de 10% não mostrou atividade antimicrobiana frente à *Escherichia coli* e ao *Proteus mirabilis* pelo método de difusão em disco (Gonçalves et al., 2005), assim como no trabalho de De Biasi et al. (2009), que também não encontraram efeito antibacteriano do extrato de erva mate na concentração de 50 e 100mg/mL, pelo método de difusão em disco frente a *Escherichia coli*, entretanto as duas concentrações foram eficientes contra o *Proteus mirabilis*, com halo de inibição variando entre 10 e 20mm, de acordo com a parte da planta utilizada e a exposição ou não ao sol.

A divergência dos dados encontrados nos diferentes trabalhos quanto a sensibilidade dos microrganismos frente aos extratos naturais das plantas pode ocorrer por diversos fatores tais como qual a parte da planta utilizada, a época da colheita, o método de extração e a exposição ou não dessa planta ao sol (De Biasi et al., 2009), o que está relacionado à concentração dos compostos bioativos presentes nos extratos.

Apesar das duas bactérias testadas que podem contaminar a carne de frango terem sido sensíveis frente ao extrato de erva mate, não houve controle expressivo do crescimento microbiano quando o extrato foi aplicado diretamente sobre o peito de frango durante os sete dias de armazenamento. Resultado semelhante foi encontrado por Schirmer & Langsrud, (2010) que investigaram o efeito inibitório de antimicrobianos naturais sobre o crescimento de bactérias deteriorantes típicas de carne suína. Os autores determinaram a concentração inibitória mínima (MIC) dos antimicrobianos frente aos microrganismos testados e, posteriormente, os aplicaram na carne suína embalada a vácuo no intuito de avaliar

o efeito na sua preservação, entretanto verificaram que concentrações de até 10 vezes os valores do MIC não evidenciaram efeito sobre o crescimento microbiológico na carne suína. Os valores da contagem bacteriana total em todas as amostras alcançaram valores de 10^7 UFC/g entre o dia 4 e o dia 7 de armazenamento, resultado bem semelhante para a contagem de bactérias mesofílicas totais e psicrotróficos totais encontrados nesta pesquisa.

Além disso, foi possível observar também regressões de segundo grau significativas ($P < 0,0001$) entres os tratamentos CN, 125, 250 e 550mg/ml de extrato de EM, tanto para a *E. coli* quanto para o *P. mirabilis*, levando à formação de parábolas com concavidade voltada para baixo. Quanto maior a concentração de EM, maior o halo de inibição formado para as duas bactérias analisadas, até atingir o ponto de inflexão que foi de 398mg/ml e 385mg/ml de extrato de EM frente a *E. coli* e ao *P. mirabiis*, respectivamente (Gráfico 3.5).

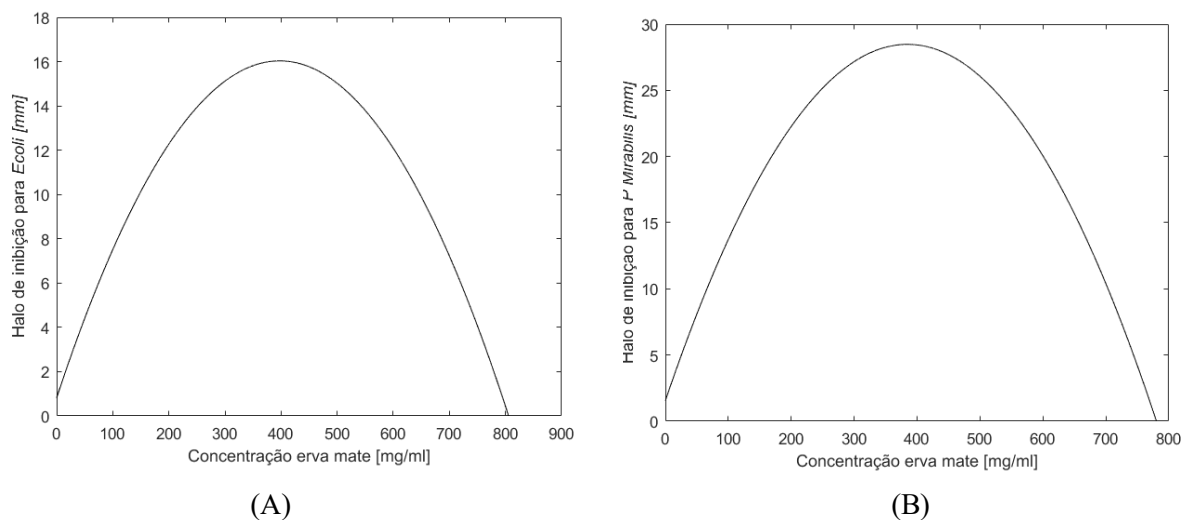


Gráfico 3.5- Representação gráfica das regressões quadráticas da atividade antimicrobiana das diferentes concentrações de extrato de EM frente à *E. coli* (A) e ao *P. mirabilis* (B).

6. CONCLUSÃO

A utilização do extrato de erva-mate como antimicrobiano natural apresentou atividade frente à *E. coli* e o *P. mirabilis in vitro*, indicando boas perspectivas para a utilização de extrato de erva-mate como antimicrobiano natural, obtendo-se a concentração antimicrobiana ideal de 400mg/ml frente as duas bactérias analisadas. Porém, essa atividade antimicrobiana não foi encontrada quando da adição do extrato de EM diretamente à carne do peito de frango cru, uma vez que nenhuma das concentrações usadas foi capaz de prolongar o tempo de prateleira da carne refrigerada, sugerindo talvez, a utilização de maiores concentrações deste extrato em futuros trabalhos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRACESCO, A., SANCHEZ, A.G., CONTRERAS, V., MENINI, T., GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378-384, 2011.
- BONA, E.A. M., PINTO, F.G. S., BORGES, A.M.C., WEBER, L.D., FRUET, T.K., ALVES, L.F.A., MOURA, A.C. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) sobre Sorovares de *Salmonella* spp. de Origem Avícola. **Ciênc. Biol. Saúde**. v.12, p.45-8, 2010.
- BURRIS, K. P., DAVIDSON, P. M., STEWART, C. N., JR., HARTE, F. M. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, v.76, p.456-462, 2011.
- BURRIS, K. P., HARTE, F. M., DAVIDSON, P. M., STEWART, C. N., ZIVANOVIC, S. Composition and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): A review. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.72, p.268-274, 2012.
- BURRIS, K. P., HIGGINBOTHAM, K. L., STEWART, C. N., JR. Aqueous extracts of yerba mate as bactericidal agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a microbiological medium and ground beef mixtures. **Food Control**, v. 50, p.748-753, 2015.
- CAMARGO, E. R. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos, resíduos aquosos e das frações de acetato de etila de *Ilex paraguariensis* st. hil. (erva mate)**. 2010. 86p. Dissertação em Ciência da Saúde da Universidade São Francisco, Bragança Paulista. 2010.
- CARDOSO, A.L.S.P., CASTRO, A.G.M., TESSARI, E.N.C., BALDASSI, L., PINHEIRO, E.S. Pesquisa de *Salmonella* spp, coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. **Higiene Alimentar**, v.19, p.144- 150, 2005.
- CARELLI G., MACEDO, S.M.D., VALDUGA, A.T., CORAZZA, M.L., OLIVEIRA, J.V., RANCESCHI, E., VIDAL, R., JASKULSKI, M.R. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hil.) obtido por extração com CO₂ supercrítico. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.13, p.110-115, 2011.

CARVALHO, A.C.F.B., CORTEZ, A.L.L., SALOTTI, B.M., BÜRGER, K.P., VIDAL-MARTINS, A.M.C. Presença de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. **Arq. Inst. Biol.**, v.72, p.303-307, 2005.

DE BIASI, B., GRAZZIOTIN, N.A., HOFMANN JR, A.E. Atividade antimicrobiana dos extratos de folha e ramos da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 582-585, 2009.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Editora Artmed: Porto Alegre, 2002, 424p.

GONÇALVES A.L., ALVES FILHO A., MENEZES H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.**, v.72, p.353-358, 2005.

IBRAHIM, H. M., ABOU-ARAB, A. A., SALEM, F. M. A. Antioxidant and antimicrobial effects of some natural plant extracts added to lamb patties during storage. **Grasas y aceites**, v.62, p.139-148, 2011.

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, p. 112-120, 2013.

KRISHNAN, K. R., BABUSKINA S., BABU, P. A. S., SASIKALA, M., SABINA, K., ARCHANA, G., SIVARAJAN, M., SUKUMAR, M. Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.171, p.32-40, 2014.

MILANI, L. I. G. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos de caqui (*Diospyros kaki* L.) para proteção de produtos cárneos**. 2012. 169p. Tese em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. 2012.

OLIVEIRA, K. A. M., OLIVEIRA, G. V., BATALINI, C., ROSALEM, J. A., RIBEIRO, L. S. Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonóides e Fenóis totais em diferentes extratos de Própolis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, p. 211-222, 2012.

PENTEADO, F. R., ESMERINO, L. A. Avaliação da qualidade microbiológica da carne de frango comercializada no município de ponta grossa - paraná. **Biol. Health Sci.**, v.17, p. 37-45, 2011.

PEREIRA, M. G. **Aplicação de antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de ave**. 2009. 126p. Dissertação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grade do Sul. 2009.

SCHIRMER, B.C., LANGSRUD, S. Evaluation of Natural Antimicrobials on Typical Meat Spoilage Bacteria *In Vitro* and in Vacuum-Packed Pork Meat. **Journal of Food Science**, v.75, p.98-102, 2010.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A., TANIWAKI, M.H., SANTOS, R.F.S., GOMES, R.A.R. Manual de Métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4.Ed.- Livraria Varela: São Paulo, 2010, 624p.

SPOTO, M. H. F., GALLO, C. R., DOMARCO, C. R., ALCARDE, A. R., WALDER, J. M. M., BLUMER, J. Radiação gama na redução da carga microbiana de flés de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, p.397-400, 1999.

VAQUERO, M. J. R., SERRAVALLE, L. R. T., NADRA, M. C. M., SAAD, A. M. S. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. **Food Control**, v.21, p.779–785, 2010.

VIEIRA, C.R.N., TEIXEIRA, C.G. Condições higiênico-sanitárias de carcaças resfriadas de frango comercializadas em Poços de Caldas-MG. **Higiene Alimentar**, v.11, p.36-40, 1997.

CAPÍTULO 4

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O consumo da erva-mate é bem expressivo na América do Sul principalmente por uma questão cultural. Devido ao crescente interesse da população por produtos mais naturais, o estudo dos diversos benefícios oferecidos pelos compostos presentes na *Ilex paraguariensis* permite a sua utilização não somente como bebida energética, mas também na indústria farmacêutica e de alimentos.

O uso do extrato de erva-mate como um aditivo em carnes de frango ainda é pouco estudado, todavia os resultados encontrados por diversos autores em relação ao seu potencial antioxidante e antimicrobiano tornam a planta uma fonte interessante na substituição de produtos sintéticos.

A pesar de não ter proporcionado redução na contagem de microrganismos nos peitos de frango resfriados durante o tempo de armazenamento, o extrato se mostrou um excelente antioxidante principalmente nas concentrações de 0,15 e 0,2%. Sendo ideal verificar em próximos estudos se concentrações mais elevadas do extrato de erva mate seriam capazes de conter ou desacelerar o crescimento microbiano.

É relevante ainda o estudo das características sensoriais quando da adição de extratos vegetais além da avaliação do sinergismo entre dois ou mais extratos vegetais para a elaboração de um aditivo com maior potencial de proteção dos produtos cárneos e que não interfira nas características sensoriais desses produtos.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, C. A. Oxidation and antioxidants. In: **Nutricines: Food components in health and nutrition**. Nottingham :Nottingham University Press. 1999.

AHN, J., GRÜN, I. U., MUSTAPHA, A. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. **Food Microbiology**, v. 24, p.7-14, 2007.

ANESINI C, FERRARO G, FILIP R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. **Food Chem**, v.97, p.459–64, 2006.

ASOLINI, F. C., TEDESCO, A. M., CARPES, S. T., FERRAZ, C., ALENCAR, S. M. Atividade antioxidante e bacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, p. 209-215, 2006.

BARON, E. J., PETERSON, L. R., FINEGOLD, S. M. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 9 ed., Ed. Mosby, 1994.

BARUFFALDI, R., OLIVEIRA, M. N. **Fundamentos de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1998. 317p.

BASTOS, D. H. M.; TORRES, E. A. F. S. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. **Nutrire: revista da Sociedade Brasileira de Alimentos**, v. 26, p. 77-89, 2003.

BASTOS, D. H. M., ISHIMOTO, E. Y., MARQUES, M.O.M., FERRI, A. F., TORRES, E. A. F. S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.538–543, 2006.

BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **Jour Nut**. 133, 3248-3254, 2003.

BENDAHOU, M., MUSELLI, A., DUBOIS-GRIGNON, M., BENYOUCEF, M., DESJOBERT, J., BERNARDINI, A., COSTA, J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. **Food Chemistry**, v. 106, p. 132-139, 2008.

BERTÉ, K. A. S., BEUX, M. R., SPADA, P. K. W. D. S., SALVADOR, M., HOFFMANN-RIBANI, R. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Yerba-Mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) Extract as Obtained by Spray Drying. **J. Agric. Food Chem**, v. 59, p. 5523–5527, 2011.

BONA, E.A.M., PINTO, F.G.S, BORGES, A.M.C., WEBER, L.D., FRUET, T.K., ALVES, L.F.A., MOURA, A.C. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) sobre Sorovares de *Salmonella* spp. de Origem Avícola. **Ciênc. Biol. Saúde**. v.12, p.45-8, 2010.

BRACESCO, A., SANCHEZ, A.G., CONTRERAS, V., MENINI, T., GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**,v. 136, p. 378-384, 2011.

BURRIS, K. P., HARTE, F. M., DAVIDSON, P. M., STEWART, C. N., ZIVANOVIC, S. Composition and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): A review. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.72, p.268-274, 2012.

BURRIS, K. P., HIGGINBOTHAM, K. L., STEWART, C. N., JR. Aqueous extracts of yerba mate as bactericidal agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a microbiological medium and ground beef mixtures. **Food Control**, v. 50, p.748-753, 2015.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p. 564–582, 1999.

CARDOSO, K. F. G. **Qualidade microbiológica de filés de peito de frangos de corte submetidos à irradiação e atmosfera modificada em diferentes períodos de armazenamento**. 2008. 55p. Dissertação de mestrado em Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 2008.

CARVALHO, I. T. **Microbiologia dos alimentos**: e-Tec Brasil, Escola técnica Aberta do Brasil (ETEC-Brasil), 2010. p.79-83.

CANTOR, A.H., DECKER E. A., COLLINS, V.P. Fatty acids in poultry and egg products. In: Chow C.K.,(Ed). **Fatty acids in foods and their health implications**. 3ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 127-154.

COLPO, A. Z. C. **Perfil fitoquímico e capacidade antioxidante de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St. Hill.)**. 2012, 102p. Dissertação de Mestrado em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2012.

CUSHNIE, T.P.T., LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, p.343–356, 2005.

DAI, J., MUMPER, R. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**. 15, 7313-7352, 2010.

DE BIASI, B., GRAZZIOTIN, N.A., HOFMANN JR, A.E. Atividade antimicrobiana dos extratos de folha e ramos da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 582-585, 2009.

DE SMET, S., RAES, K., DEMEYER, D. Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: a review. **Anim. Res.** 53, 81-98, 2004.

DUKE J. A. **Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants.** Ed. CRC Press, 1992. 688p.

ESTÉVEZ, M. Oxidative damage to poultry: from farm to fork. **Poultry Science**, v.94, p.1368–1378, 2015.

FARIA, P. B., BRESSAN, M. C., SOUZA, X. R., RODRIGUES, E. C., CARDOSO, G. P., GAMA, L.T. Composição proximal e qualidade da carne de frangos das linhagens Paraíso Pedrês e Pescoço Pelado. **R. Bras. Zootec.**, v.38, p.2455-2464, 2009.

FILIP R, LOTITO SB, FERRARO G, FRAGA CG. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutr Res.**, v20, p.1437–46, 2000.

FILIP R, LOPEZ P, GIBERTI G, COUSSIO J, FERRARO G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v.72, p.774–778, 2001.

FOGAÇA, F. H. S., SANT'ANA, L. S. Oxidação lipídica em peixes: mecanismo de ação e prevenção. **Archives of Veterinary Science**, v. 14, p. 117-127, 2009.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar.** Editora Artmed: Porto Alegre, 2002, 424p.

FRANK, H., THIEL, D., MACLEOD, J. Mass spectrometric detection of cross-linked fatty acids formed during radical-induced lesion of lipid membranes. **Biochem. J.**, v.260, p.873-878, 1989.

FRANKEL, E. N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality, **Food Chemistry**, v. 57, p. 5–51, 1996.

GIROLOMETTO, G., AVANCINI, C. A. M., CARVALHO, H. H. C., WIEST, J. M. Atividade antibacteriana de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.). **Revista Brasileira de Plantas Médicas**, v.11, p.49-55, 2009.

GONÇALVES A.L., ALVES FILHO A., MENEZES H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.**, v.72, p.353-358, 2005.

GORDON, M.H. The development of oxidative rancidity in foods In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food : Practical applications** Cambridge : Woodhead Publishing, 2001. p. 7-21.

GOVARIS, A., BOTSOGLOU, N., PAPAGEORGIOU, G., BOTSOGLOU, E., AMBROSIADIS, I. Dietary versus post-mortem use of oregano oil and/or α -tocopherol in turkeys to inhibit development of lipid oxidation in meat during refrigerated storage. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v.55, p.115-123, 2004.

GOVARIS, A., BOTSOGLOU, E., FLOROU-PANERI, P., MOULAS, A. PAPAGEORGIOU, G. Dietary supplementation of oregano essential oil and tocopheryl acetate on microbial growth and lipid oxidation on turkey breast fillets during storage. **International Journal of Poultry Science**, v.4, p.969-975, 2005.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v.224, p.338–344, 1996.

HECK, C.I., DE MEJÍA, E.G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, p.138-151, 2007.

HECK, C.I., SCHMALKO, M., DE MEJIA, E.G. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.56, p.8394-8403, 2008.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da extração vegetal e da silvicultura de 2005. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=774>> Acessado em: 24 de fevereiro. 2016.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da extração vegetal e da silvicultura de 2014. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=774>> Acessado em: 24 de fevereiro. 2016.

IBRAHIM, H. M., ABOU-ARAB, A. A., SALEM, F. M. A. Antioxidant and antimicrobial effects of some natural plant extracts added to lamb patties during storage. **Grasas y aceites**, v.62, p.139-148, 2011.

ISOLABELLA, S., COGOI, L., LOPEZ, P., ANESINI, C., FERRARO, G., FILIP, R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v.122, p.695-699, 2010.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Ed Artmed: Porto Alegre. 2005. 711p.

KRISHNAN, K. R., BABUSKINA S., BABU, P. A. S., SASIKALA, M., SABINA, K., ARCHANA, G., SIVARAJAN, M., SUKUMAR, M. Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.171, p.32–40, 2014.

KUBO, I. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. **Journal Agricultural Food Chemicals**, v.41, p.107-11, 1993.

LAGUERRE, M., LECOMTE, J., VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v.46, p.244-282, 2007.

LIMA JUNIOR, D. M., RANGEL, A. H. N., URBANO, S. A., MORENO, G. M. B. Oxidação lipídica e qualidade da carne ovina. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, p.14-28, 2013.

LIMBO, S., TORRI, L., SINELLI, N., FRANZETTI, L. & CASIRAGHI, E. Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. **Meat Science**, v.84, p.129–136, 2010.

LÓPEZ, J. F., ZHI, N., ALESON-CARBONELL, L., PÉREZ-ALVAREZ, J. A., KURI, V. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. **Meat Science**, v.69, p.371–380, 2005.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A., **Plantas Medicinais no Brasil, nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. 2 ed., 2008, p.90-91.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J. M., DUNLAP P. V., CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12ed. Ed. Artmed: Porto Alegre. 2010, 1160p.

MARIUTTI, L.R.B., BRAGAGNOLO, N. A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.68, p.1-11, 2009.

MARTIN, J.G.P. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais: erva-mate e resíduos agroindustriais**. 2011. 98p. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

MARTIN, J. G. P., PORTO, E., ALENCAR, S. M., GLÓRIA, E. M., CORRÊA, C. B., CABRAL I. S. R. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. **Rev Argent Microbiol.**, v.45, p.93-98, 2013.

MATSUMOTO, R.L., BASTOS, D.H., MENDONÇA, S., NUNES, V.S., BARTCHEWSKY, W., RIBEIRO, M.L., CARVALHO, P.O. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes ,lipid peroxidation, and total antioxidants status in healthy young women. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.1775–1780, 2009.

MEINHART, A.D., BIZZOTTO, C.S., BALLUS, C.A., POLONI RYBKA, A.C., SOBRINHO, M.R., CERRO-QUINTANA, R.S., TEIXEIRA-FILHO, J., GODOY, H.T. Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.2188-2193, 2010.

MELO, E.A., GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA**, v.36, p. 1-11, 2002.

MELTON, S. Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. **Food Technol.** v.37, p.105 - 111, 1983.

MILANI, L. I. G., TERRA, N. N.; FRIES, L. L. M., REZER, A. P. S., FERREIRA, S. F., CICHOSKI, A. J., VALENTE, C. R. F. Oxidação lipídica, características sensoriais e cor da

carne de frango adicionada de extratos de caqui (*Diospyros kaki*, L.) e submetida a tratamento térmico. **Braz. J. Food Technol.**, v. 13, p. 242-250, 2010.

MILANI, L. I. G. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos de caqui (*Diospyros kaki* L.) para proteção de produtos cárneos.** 2012. 169p. Tese em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. 2012.

MIN, B.; AHN, D. U. Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products - A review. **Food Sci. Biotechnol.**, v.14, p.152– 163, 2005.

NACZK M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extracion and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p.1523-1542, 2006.

NAIDU, A. S. **Natural food antimicrobial systems.** CRC Press, 2000. 818p.

NAIR V.; TURNER G.A. The thiobarbituric acid test for lipid peroxidation: structure of the adduct with malondialdehyde. **Lipids**, v.19, p.804–805, 1984.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica.** 4ed. Sarvier: São Paulo:, 2006. 1202p.

NEPA - NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.** 4ed. Editora UNICAMP: Campinas, SP, p. 16-104, 2011.

NOVELLO, D., OST, P. R., FONSECA, R. A., NEUMAM, M., FRANCO, S. G., QUINTILIANO, D. A. Avaliação bromatológica e perfil de ácidos graxos da carne de frangos de corte alimentados com rações contendo farinha de peixe ou aveia-branca. **R. Bras. Zootec.**, v.37, p.1660-1668, 2008.

O'KEEFE, S. F. Nomenclature and Classification of Lipids. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Technology.** 2ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2002. p. 1-40.

OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia veterinária, guia bacteriológico prático.** 2ed. Ed. ULBRA: Canoas. 2000. 240p.

OPALA, T., RZYMSKIP, P., PISCHEL, I., WILCZAK, M., WOZNIAK, J. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on bodyweight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects – a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. **Eur J Med Res**, v.11, p.343–50, 2006.

OSAWA, C. C., FELÍCIO, P. E., GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Quim. Nova**, v.28, p.655-663, 2005.

PAGLIOSA, C.M. **Caracterização química do resíduo de ervais e folhas “in natura” de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.).** 2009, 146p. Dissertação de Mestrado em

Ciências dos Alimentos - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

PENTEADO, F. R., ESMERINO, L. A. Avaliação da qualidade microbiológica da carne de frango comercializada no município de ponta grossa - paraná. **Biol. Health Sci.**, v.17, p. 37-45, 2011.

PIKUL J., LESZCZYNSKI D.E., BECHTEL P.J., KUMMEROW F.A. Effect of frozen storage and cooking on lipid oxidation in chicken meat. **J Food Sci**, v.49, p.838-43, 1984.

POKORNÝ, J. Introduction In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food : Practical applications** Cambridge : Woodhead Publishing, 2001. p. 3-5.

QUINN, P.J., MARKET, B.K., CARTER, M.E., DONNELLY, N.J., LEONARD, F.C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Ed. Artmed: São Paulo. 2005. 512p.

RACANICCI, A.M.C., DANIELSEN, B., SKIBSTED, L. H. Mate (*Ilex paraguariensis*) as a source of water extractable antioxidant for use in chicken meat. **European Food Research and Technology**, v.277, p. 255-260, 2008.

RACANICCI, A.M.C., ALLESEN-HOLM, B. H., SKIBSTED, L.H. Sensory evaluation of precooked chicken meat with mate (*Ilex paraguariensis*) added as antioxidant. **European Food Research Technology**, v. 229, p. 277–280, 2009.

RALL, V. L. M., MARTIN, J. G. P., CANDEIAS, J. M. G., CARDOSO, K. F. G., SILVA, M. G., RALL, R., ARAÚJOJÚNIOR, J. P. Pesquisa de *Salmonella* e das condições sanitárias em frangos e linguiças comercializados na cidade de Botucatu. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. 46, p. 167-174, 2009.

RAMALHO, V. C., JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quim. Nova**, v. 29, p.755-760, 2006.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Guanabara Koogan: .Rio de Janeiro 6 ed, 2001. 906p.

RIBANI, R. H. **Compostos fenólicos em erva-mate e frutas**. 2006. 138p. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

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

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. UFSC, Florianópolis, 2007. 1102p.

SAXENA, M., SAXENA, J., PRADHAN, A. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v.16, p.130-134, 2012.

SCHMALKO, M. E., ALZAMORA, S. M. Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during YerbaMate processing. **Drying Tech**, v.19 p.599–610, 2001.

SCHINELLA, G. R., TROIANI, G., DA' VILA, V., DE BUSCHIAZZO, P. M., TOURNIER, H. A. Antioxidant Effects of an Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.269, p.357–360, 2000.

SHAN B., CAI, Y., BROOKS, J. D., CORKE, H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, p.112–119, 2007.

SOARES, D. J., TAVARES, T. M., BRASIL, I. M., FIGUEIREDO, R. W., SOUSA, P. H. M. Processos oxidativos na fração lipídica de alimentos. **B. CEPPA**, v. 30, n. 2, p.263-272, 2012.

SPOTO, M. H. F., GALLO, C. R., DOMARCO, C. R., ALCARDE, A. R., WALDER, J. M. M., BLUMER, J. Radiação gama na redução da carga microbiana de filés de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.3, p.397-400, 1999.

TAJKARIMI M. M., IBRAHIM, S.A., CLIVER, D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v.21, p.1199–1218, 2010.

TURKMEN, N., SARI, F., VELIOGLU, Y. S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black tea and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. **Food Chem.**, v.99, p.835–841, 2006.

VALDUGA, E., FREITAS, R. J. S. de, REISSMANN, C. B., NAKASHIMA, T. Caracterização química da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate) e de outras espécies utilizadas na adulteração do mate. **Boletim do Centro de pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 15, n. 1, p. 25-36, 1997.

VENTANAS, S., ESTÉVEZ, M., DELGADO, C. L., RUIZ, J. Phospholipid oxidation, non-enzymatic browning development, volatile compound generation in model systems containing liposomes from porcine *Longissimus dorsi* and selected amino acids. **Europe Food Research and Technology**, v. 225, p. 665-675, 2007.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 2ed, Artmed: . Porto Alegre. 2008. 1241p.

WOJCIAK, K. M., DOLATOWSKI, Z. J. Oxidative stability of fermented meat products. **Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.**, v.11, p.99-109, 2012.

WOOD, J. V., ENSER, M., FISHER, A. V., NUTE, G. R., SHEARD, P. R., RICHARDSON, R. I., HUGHES, S. I., WHITTINGTON, F. M. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. **Meat Science**, v.78, p. 343–358, 2008.

YANISHLIEVA-MASLAROVA, N.V. Inhibiting Oxidation. In: POKORNY, J., YANISHLIEVA, N., GORDON, M. **Antioxidants in Food: Practical Applications**. 1ed. Inglaterra: Woodhead Publishing, 2001. p. 35-84.

YIN, M., CHENG, W. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. **Meat Science**, v.63, p.23–28, 2003.

ZHOU, G.H., XU, X.L., LIU, Y. Preservation technologies for fresh meat – A review. **Meat Sci.** v.86, p.119–128, 2010.

ANEXO 1



**GRUPO
CENTROFLORA**
Parcerias para um mundo melhor.

ESPECIFICAÇÃO

Revisão(s)		
Rev	Data	Revisor
3	12/02/2013	JBATISTA
2	04/01/2013	FANGELLA
1	30/07/2012	MDSANTOS

RQ2-059 Rev.00

Página 1 / 1 - Impressa em: 10/09/2013 09:05:23

MATE EXTRATO SECO

Cód/Produto : 81045 - **Mate Extrato Seco 2-6 % Orgânico**
Nome Científico : *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.
Parte Usada : Folha
Excipientes Utilizados : Nenhum
Solvente de Extração : Água (65-85 %) e Etanol (15-35 %)
Origem da Droga Vegetal : Brasil
Ratio : 4 - 6:1

Conservantes : Nenhum
Processo de Produção : Extração/Concentração/Secagem
Fabricado no : Brasil
Família : Aquifoliaceae Bercht. & J. Presl

ANÁLISES	ESPECIFICAÇÃO	METODO
Físico-químicas		
Aspecto	Pó Fino Higroscópico	IT2-100
Cafeína (HPLC) %	2,00 - 6,00	IT2-115
CCD - Mate	Perfil Cromatográfico Positivo	IT2-331
Cinzas Totais %	Informativo	IT2-003
Cor	Pardo Esverdeado	IT2-100
Granulometria	Min. 98% 40 mesh	IT2-107
Odor	Sem Diferenças Significativas	IT2-168
pH (sol. 10%)	4,50 - 6,50	IT2-100
Resíduo de Etanol %	Max 0,500	IT2-199
Solubilidade em Água	Solúvel a Parcialmente Solúvel	IT2-360
Umidade %	Max 6,00	IT2-100
Microbiologia		
Bactérias Totais	< 10.000 UFC/g	IT2-046
Escherichia coli	Ausente em 1 g	IT2-047
Fungos e Leveduras	< 100 UFC/g	IT2-046
Pseudomonas aeruginosa	Ausente em 1 g	IT2-047
Salmonella sp	Ausente em 10 g	IT2-047
Staphylococcus aureus	Ausente em 1 g	IT2-047

Obs. : O monitoramento de Aflatoxinas B1 (Max. 2,0 g/kg), Aflatoxinas B1+B2 +G1+G2 (Max. 4,0 g/kg), Metais Pesados (As - Max 1,0 ppm; Cd - Max. 0,5 ppm; Hg - Max. 0,1 ppm; Pb - Max. 1,0 ppm) e Resíduo de Pesticidas (De acordo com Lei CE e Ph Eur (Item 2.8.13)) é realizado de acordo com procedimentos internos estabelecidos pelo fabricante.

Validade : 02 ano(s)

Armazenagem : O produto deve ser armazenado em recipientes bem fechados, protegidos do calor e da umidade. Embalagens abertas devem ser fechadas imediatamente.

Embalagem : Barrica de fibra de 25 kg contendo embalagem plástica dupla.

ANEXO 2

Composto Fenólico	(mg g⁻¹ de extrato)
Ácido 1,3-dicafeoilquinico	9,14 ± 0,43 10 ⁻²
Ácido 1,5-dicafeoilquinico	6,01 ± 0,01
Ácido cafeico	8,13 ± 0,02 10 ⁻¹
Ácido clorogênico	12,30 ± 0,01
Ácido <i>p</i> -cumárico	6,25 ± 1,80 10 ⁻³
Ácido ferúlico	5,45 ± 0,08 10 ⁻²
Ácido gálico	1,79 ± 0,43 10 ⁻²
Ácido quínico	8,77 ± 0,06 10 ⁻¹
Ácido xiquímico	1,17 ± 0,01 10 ⁻²
Quercetina	1,12 ± 0,04 10 ⁻¹
Rutina	8,55 ± 0,02 10 ⁻¹
Total	21,15 ± 0,04