



**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E
BIOTECNOLÓGICOS**

ANDRESSA TONET

**ATIVIDADE BIOLÓGICA E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM
EXTRATO DE ERVA MATE E SUA APLICAÇÃO EM HAMBÚRGUER DE PEIXE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

TOLEDO

2017

ANDRESSA TONET

**ATIVIDADE BIOLÓGICA E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM
EXTRATO DE ERVA MATE E SUA APLICAÇÃO EM HAMBÚRGUER DE PEIXE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Toledo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Tatiana Shioji Tiuman

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara

TOLEDO

2017



Ministério da Educação



Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos

TERMO DE APROVAÇÃO

ATIVIDADE BIOLÓGICA E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM EXTRATO DE ERVA MATE E SUA APLICAÇÃO EM HAMBÚRGUER DE PEIXE

Por

ANDRESSA TONET

Essa dissertação foi apresentada às treze horas e trinta minutos, do dia cinco de julho de dois mil e dezessete, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos, Linha de Pesquisa Processos Biotecnológicos, no Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos – PPGQB, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho Aprovado.

Profª Drª Tatiana Shioji Tiuman (Orientadora – PPGQB)

Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara (Co-orientador – PPGQB)

Prof. Dr. Clayton Antunes Martin (Membro Interno – PPGQB)

Profª Drª Roberta Letícia Krüger (Membro externo – Unicentro)

“O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Programa”.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por estar comigo em todos os momentos.
- Aos meus pais e irmãos pelo encorajamento, compreensão, preocupação e orações.
- Ao meu noivo Bruno pelo carinho, atenção, compreensão pela minha ausência e incentivo em todos os momentos.
- Aos amigos, especialmente Daniel, pelo apoio, estímulo e auxílio.
- A minha orientadora Tatiana Tiuman e coorientador Ricardo Zara, pelo conhecimento repassado.
- Ao laboratório de pesquisa e desenvolvimento analítico da PRATI, DONADUZZI & CIA LTDA em especial a Lislaine Deconto e toda equipe, pelo incentivo e cooperação incondicional no desenvolvimento do trabalho.
- Aos professores, técnicos de laboratório, acadêmicos e funcionários da Universidade Federal do Paraná – campus Toledo.
- Aos meus colegas do mestrado pela companhia, amizade e incentivo em todos os momentos.
- A Fundetec, em especial a Sabrine e Diana, pelo incentivo e auxílio no projeto.
- A todos aqueles que de alguma maneira colaboraram nesta etapa de crescimento profissional e pessoal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore de erva mate (A), folhas (B), flores e frutos característicos da espécie (C)	14
Figura 2 - Distribuição geográfica da erva mate no Brasil, Paraguai e Argentina.	15
Figura 3 - Reação de oxido-redução do radical DPPH.	20
Figura 4- Reação do complexo férrico com o reagente de FRAP e o antioxidante.....	21
Figura 5 - Estruturas moleculares do ácido benzoico (a) e ácido hidroxicinâmico (b).	22
Figura 6 - Reação dos compostos fenólicos com reagente de Folin Ciocalteu.	24
Figura 7 - Estrutura básica dos flavonoides	25
Figura 8 - Formação do complexo flavonoide e alumínio	26
Figura 9 – Levantamento do número de artigos publicados no período de 1999 a 2016 referente ao tema de atividade antimicrobiana de plantas medicinais.	27
Figura 10 - Cromatograma do extrato de erva mate preparado em metanol e água, acrescido de quercetina, rutina, ácido clorogênico e cafeína.	57
Figura 12 - Superfície de resposta para porcentagem de inibição do radical DPPH em diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de BHA (B) e extrato de erva mate (A) combinados.	62
Figura 13 – Análise de coliformes termotolerantes das cinco formulações avaliadas pro um período de 28 dias.	66
Figura 14- Análise de mesófilos das cinco formulações avaliadas por um período de 28 dias.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais representantes dos ácidos fenólicos e posição de substituição na estrutura base que diferenciam cada um dos compostos.	23
Tabela 2 – Principais representantes dos flavonoides e posição de substituição na estrutura base que diferenciam cada um dos grupos.	25
Tabela 3 – Contempla o planejamento experimental das diferentes concentrações de extrato de erva mate e BHA associados.	48
Tabela 4 - Formulações testadas para os hambúrgueres de peixe com e sem a adição do extrato de erva mate e BHA.	49
Tabela 5 - Resultados de DPPH, FRAP, fenólicos totais e flavonoides avaliados no extrato de erva mate e no BHA.	53
Tabela 6 – Resultados obtidos nos parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e detecção.	56
Tabela 7 – Resultados de desvio padrão relativo e pureza de pico para os ativos (exceto quercetina) obtidos no parâmetro de robustez.	59
Tabela 8 - Análise centesimal do hambúrguer de peixe envolvendo teste de umidade, proteínas totais, cinzas, lipídios totais e carboidratos.	63

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

- AOAC - Association Of Analytical Communities (Associação de comunidades analíticas)
- BHA - Butil hidroxianisol
- CBM – Concentração Bactericida mínima
- CG – Cromatografia gasosa
- CIF – Concentração Inibitória Fracionada
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência
- CLUE – Cromatografia Líquida de ultra eficiência
- CTT – Cloreto de Trifeniltetrazólio
- DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
- EAG – Equivalente ácido gálico
- ELSD – Evaporative light scattering detection (detector evaporativo de espalhamento de luz)
- EM – Espectrometria de massas
- EQ g⁻¹ – Equivalente a quercetina por grama
- FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power (poder antioxidante de redução do ferro)
- ICIF – Índice de Concentração Inibitória Mínima
- IP – Índice de Peróxido
- mEq kg⁻¹ – Miliequivalente por kg
- PVDF - Polyvinylidene difluoride (difluoreto de polivinilideno)
- RMN – Ressonancia magnética nuclear
- TBARS - Thiobarbituric acid reactive substances (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)
- TFA – Trifluoroacetic acid (ácido trifluoroacético)
- TPTZ - 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine
- UFC – Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVO	12
2.1	Objetivo geral	12
2.2	Objetivos específicos	12
3	REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1	Produtos naturais	13
3.2	Erva mate	14
3.3	Separação e quantificação de compostos	17
3.4	Propriedades antioxidantes	19
3.4.1	<i>Avaliação da atividade antioxidante</i>	20
3.4.2	<i>Compostos fenólicos</i>	21
3.4.3	<i>Flavonoides</i>	24
3.5	Propriedades antimicrobianas	26
3.5.1	<i>Métodos de avaliação da atividade antimicrobiana</i>	28
3.6	Conservantes	28
3.7	Aplicação de insumos naturais em alimentos	30
4	REFERÊNCIAS	32
	CAPITULO 1	40
1	INTRODUÇÃO	42
2	MATERIAL E MÉTODO	44
2.1	Material vegetal e butil hidroxianisol	44
2.2	Atividade antioxidante	44
2.3	Quantificação de compostos fenólicos e flavonóides totais	45
2.4	Atividade antimicrobiana do extrato de erva mate e BHA	46
2.5	Análise de interação antimicrobiana por <i>checkerboard</i>	46
2.6	Densenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de compostos de erva mate por cromatografia líquida de ultra eficiência	47
2.7	Atividade antioxidante combinada (extrato de erva mate x BHA)	48
2.8	Aplicação do extrato de erva mate ao hambúrguer de peixe	49
2.9	Análises físico-químicas	50
2.10	Avaliação da oxidação lipídica	51
2.11	Análises microbiológicas do hambúrguer de peixe	51

2.12	Análises estatísticas	52
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1	Atividade antioxidante e quantificação de fenólicos totais e flavonoides	53
3.2	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	55
3.3	Desenvolvimento e validação do método analítico	56
3.4	Quantificação de compostos por cromatografia líquida de ultra eficiência	59
3.5	Atividade antioxidante combinada (extrato de erva mate x BHA).....	61
3.6	Interação antimicrobiana por <i>checkerboard</i>	62
3.7	Caracterização físico-química	63
3.8	Avaliação da oxidação lipídica.....	64
3.9	Avaliação microbiológica	65
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
5	REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

O avanço científico envolvendo estudos voltados às plantas medicinais vem sendo abordado cada vez mais, tanto ao que se diz respeito a investigações da composição química, quanto farmacológica, que pretendem elucidar novas moléculas com propriedades terapêuticas. O estudo do potencial farmacológico de plantas medicinais e seus constituintes, tais como flavonoides, alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, entre outros, tem sido objeto de contínuos e importantes estudos (SHAKYA, 2016).

Dentre os constituintes de importância medicinal e de maior interesse presentes nas plantas estão os metabólitos secundários, estruturas geralmente complexas, de baixo peso molecular e atividade biológica marcante (BERG e LUBERT, 2008). Segundo Pereira e Cardoso (2012), a origem dos metabólitos secundários se deve a mecanismos de defesa e adaptação da planta ao meio.

O Brasil é o país com a maior biodiversidade genética do mundo, com aproximadamente 55 mil espécies catalogadas (de um total estimado entre 350 a 550 mil), e conta com ampla tradição do uso das plantas medicinais vinculada ao conhecimento popular transmitido entre gerações (FONSECA, 2012). Isso se deve a sua grande extensão territorial e condições climáticas favoráveis encontradas no país (PEREIRA e CARDOSO, 2012).

Uma planta tradicional e nativa do Brasil é a erva mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.), planta pertencente à família *Aquifoliaceae* muito explorada na região sul do continente americano, principalmente por países como a Argentina, Brasil e Paraguai (PIMENTEL et al., 2006).

Segundo levantamento realizado por Pagliosa (2009), com base no estudo realizado por Mazuchowski e Rücker (1997), a erva mate tem sido explorada tanto pela indústria alimentícia quanto pela indústria química. Na indústria alimentícia esse produto é apreciado em bebidas como chimarrão, tererê, chá mate e mate solúvel, na forma de infusão quente ou fria. A planta também é utilizada em refrigerantes, sucos, cervejas e vinhos, a partir do extrato diluído das folhas. Ainda na indústria de alimentos, a clorofila e óleos essenciais extraídos da erva mate são aplicados como insumos de alimentos na forma de corante e conservante natural em sorvetes, balas, bombons, chicletes e gomas.

De acordo com Nakamura (2008) o extrato de *Ilex paraguariensis* possui em sua composição saponinas triterpênicas, cafeína, teobromina e ácido clorogênico. Segundo Ito e Crozier (1997), a cafeína possui propriedade antioxidante, estimulante e vasodilatadora, e a teobromina atividade antioxidante e diurética. O ácido clorogênico, por sua vez, caracteriza-se por suas funções antioxidante, antimicrobiana e analgésica e as saponinas triterpênicas por seu efeito antiparasitário (FILIP et al., 2001; HECK e De Mejia, 2007).

Já na indústria de medicamentos a erva mate tem sido utilizada como estimulante do sistema nervoso central (extrato de cafeína e teobromina), e nos tratamentos de hipertensão, bronquite e pneumonia (extrato de flavonoides). A indústria química emprega o extrato de saponina e óleos essenciais em produtos de higiene geral, com finalidade bactericida, estabilizantes e emulsificantes. Por fim, a erva mate ainda pode ser aplicada em produtos de uso pessoal, perfumes, desodorantes, cosméticos ou sabonetes (PAGLIOSA, 2009).

Nos últimos anos a aplicação de conservantes naturais em alimentos tem se expandido, com a perspectiva de atender as exigências dos consumidores, que por sua vez, estão cada vez mais atentos no que diz respeito a alimentação saudável. Considerando a rica composição da erva mate em compostos bioativos, sua aplicação em produtos, sejam eles alimentícios, cosméticos ou farmacêuticos, se torna uma alternativa interessante com potencial de conservação e benefícios a saúde.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade biológica e quantificar compostos bioativos em extrato de erva mate e realizar sua aplicação em hambúrguer de peixe.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar atividade antioxidante do extrato e butil hidroxianisol (BHA) pelos métodos de FRAP e DPPH;
- Quantificar compostos fenólicos e flavonoides totais por espectrofotometria UV-VIS no extrato;
- Realizar o teste de atividade antimicrobiana por concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM);
- Analisar a interação antimicrobiana do extrato frente ao BHA pela técnica de *checkerboard*;
- Avaliar a resposta do extrato de erva mate frente ao antioxidante sintético pela técnica de DPPH;
- Desenvolver e validar metodologia analítica por cromatografia líquida de ultra eficiência para a quantificação dos compostos no extrato;
- Elaborar hambúrguer de peixe acrescido de erva mate com finalidade conservante;
- Acompanhar a estabilidade e conservação do produto por análises físico-químicas e microbiológicas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produtos naturais

A natureza, em especial o reino vegetal, fornece há tempos grande parte das moléculas de interesse científico (principalmente os metabólitos secundários) com potencial de aplicação na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e agroquímica. Mais de 80% das substâncias medicamentosas são produtos naturais ou foram inspiradas em um composto natural (WHO, 2005; NEWMAN e CRAGG, 2012).

Com isso, a química medicinal moderna frisa a importância dos produtos naturais como fonte de novos fármacos ou insumos bioativos, bem como a relevância do avanço tecnológico que favorece o mercado e garante maior confiança e reprodutibilidade nas análises de qualidade dos mesmos. Dentre esses avanços, destacam-se as condutas adotadas na seleção e coleta de plantas, técnicas de isolamento, identificação, quantificação e elucidação estrutural de moléculas orgânicas, métodos para avaliação de atividade biológica e procedimento de semi-sínteses e biossínteses (MACIEL et al., 2013).

O processo para a descoberta de produtos naturais expõe a planta a inúmeras etapas. O composto é extraído da fonte, concentrado, fracionado e purificado, produzindo essencialmente uma única substância biologicamente ativa. Embora a determinação de estruturas complexas seja tecnicamente desafiadora, este fato não é mais um impasse no processo de descoberta de novas drogas, graças aos avanços tecnológicos. Nos casos em que o perfil de atividade biológica do composto atende a potência e seletividade desejada, são realizados estudos preliminares da relação estrutura atividade para avaliar a eficiência do processo de purificação (KOEHN e CARTER, 2005).

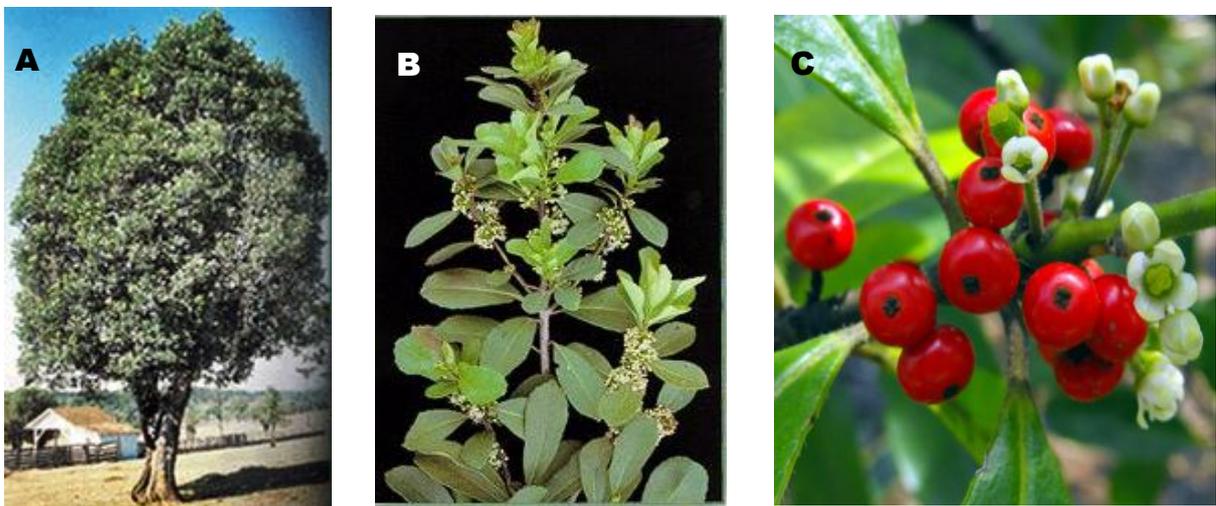
Nos últimos anos houve um crescente interesse mundial por produtos derivados da biodiversidade e, nesse aspecto, o Brasil é privilegiado, sendo detentor de grande diversidade biológica, com inúmeras espécies vegetais com potencial medicinal (DUTRA e FARIA, 2009). Vários grupos de pesquisa no Brasil se concentram em explorar esta rica biodiversidade de forma racional e estão

envolvidos nos últimos avanços na química de produtos naturais, incluindo a busca de compostos biologicamente ativos de plantas do Cerrado, da Mata Atlântica e Amazonas (VALLI et al., 2013).

3.2 Erva mate

A espécie *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. é uma planta nativa da América do Sul, que pertence à família *Aquifoliaceae*, conhecida popularmente como erva-mate. Se caracteriza por ser uma árvore perene, que pode alcançar cerca de 15 metros de altura e 40 centímetros de diâmetro de tronco (BRANCO, 2014), conforme exibido na Figura 1A. Possui folhas simples, pequenas e alternadas (Figura 1B), flores brancas e frutos avermelhados (Figura 1C). O período de floração dessa planta ocorre entre os meses de setembro a dezembro e de frutificação entre dezembro a março (SILVA, 2007).

Figura 1 - Árvore de erva mate (A), folhas (B), flores e frutos característicos da espécie (C)

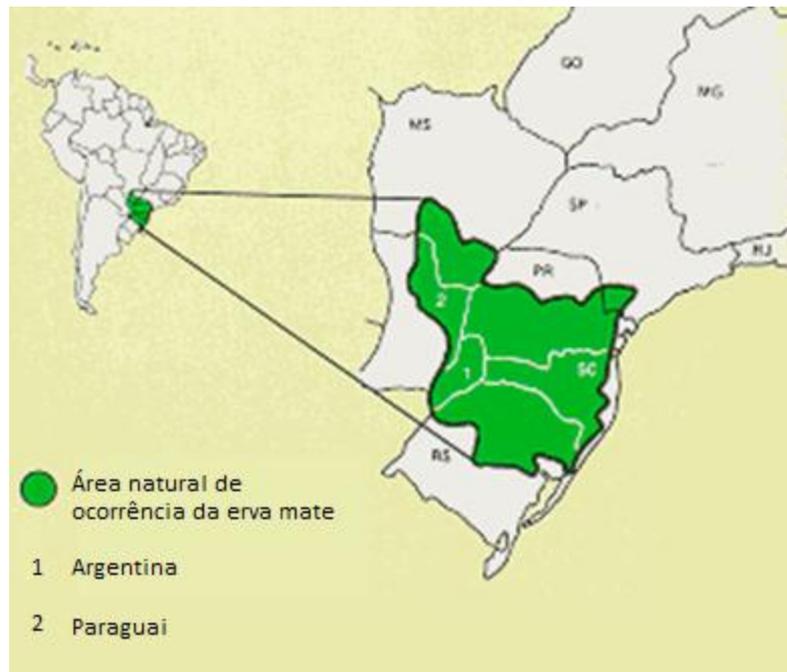


Fonte: Figura A, B – www.pinterest.com/pin (acessado em 14/06/17); Figura B - MARTIN-FABER (2017)

Por ser uma planta que sofre pouca oscilação climática, comparando-a aos demais cultivos agrícolas, a erva mate possui considerável valor socioeconômico, principalmente por manter o homem no campo (VIDOR et al., 2002). Sua distribuição

se estende por aproximadamente 540.000 km², abrangendo regiões tropicais e subtropicais do Brasil, Argentina e Paraguai, conforme exibido na Figura 2 (PAGLIOSA, 2009).

Figura 2 - Distribuição geográfica da erva mate no Brasil, Paraguai e Argentina.



Fonte: De Resende et al. (2000).

Os países do Mercosul são os principais clientes da erva-mate nacional, sendo que o Uruguai importa cerca de 85% da produção brasileira, seguido pelo Chile, que recebe 11% das exportações, além de Alemanha, Estados Unidos, Japão, Canadá, Síria, entre outros (CROCETTI, 2012).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2015), o Paraná é o maior produtor de erva-mate verde proveniente do extrativismo do país, responsável por 86% da produção nacional. Na sequência está o estado de Santa Catarina com 8%, Rio Grande do Sul com 6% e Mato Grosso do Sul com 0,1%. Esta pesquisa revelou ainda que a produção de erva-mate está presente em 151 municípios do Estado, com concentração na região sul, sendo que os maiores municípios produtores em 2013 foram: Cruz Machado, São Mateus do Sul, Bituruna,

General Carneiro, Paula Freitas e Inácio Martins. Juntos responderam por 63% da produção da cultura no Estado.

Contudo, a utilização da erva mate não se limita apenas a ingestão na forma de chás e chimarrão. Seu consumo se iniciou há muito tempo por conhecimento empírico adquirido pelos índios, que notaram seu efeito estimulante quando mascavam a folha da planta fresca ou as preparava por infusão, o que lhes garantiam maior resistência a trabalhos mais pesados (TOMAZZONI, 2004). O potencial dessa planta tem sido explorado cientificamente, tanto ao que diz respeito as atividades biológicas, estruturas químicas, mecanismos de ação, quanto suas aplicações.

Assim, cientistas brasileiros têm investido no desenvolvimento de produtos cosméticos e alimentares a base de erva mate, nos quais apresentam características sensoriais particulares, com boa aceitabilidade pelos consumidores, que servem de incentivo ao setor ervateiro (PAGLIOSA, 2009). Essa boa aceitabilidade se deve particularmente a proposta de consumir produtos naturais com apelo à saúde individual e segurança alimentar. Como exemplo de alimentos que possuem a *Ilex paraguasiensis* como insumo são gelatinas funcionais desenvolvida por Berté et al. (2011), que propõem um alimento de baixo valor calórico com benefícios antioxidantes, promovidos pela presença do extrato. Já Vieira et al. (2008) elaboraram balas a partir do pó da erva mate, que se caracterizam pelo elevado teor de fibras, que além de suplementar a dieta, tornaram o alimento funcional. Bebidas gaseificadas a base de erva mate também foram desenvolvidas e tiveram boa aceitabilidade, cujo objetivo principal foi diversificar o mercado e substituir o consumo de bebidas que acarretam prejuízos a saúde (MELLO et al., 2009). Martin et al. (2013) avaliaram o potencial antimicrobiano do extrato de erva mate contra patógenos alimentares e concluíram que o efeito microbiológico comprovado torna-o um potencial conservante natural para aplicação em alimentos.

Essa aplicação da erva mate otimiza as propriedades dos alimentos e bebidas além de desempenhar inúmeros benefícios a saúde, dentre eles efeito digestivo e hepatoprotetor (GORZALCZANY et al., 2001), efeito cardioprotetor e hipocolesterolêmico (SCHINELLA, FANTINELLI e MOSCA, 2005), ação estimulante

sobre sistema nervoso central (MENDES e CARLINI, 2007) e proteção contra processos oxidativos no organismo humano (BASTOS et al., 2006).

Os efeitos benéficos envolvidos no consumo desta planta são possíveis graças a sua rica composição química, que contempla compostos fenólicos, alcaloides e saponinas (FERNANDES, 2017), presentes principalmente nas folhas, e em menores concentrações nas demais partes da erva (MAZZAFERA, 1994). Em estudo conduzido por Jacques et al. (2007), foi possível identificar 51 compostos, dentre eles metilxantinas, fitol, estigmasterol, vitamina E, ácido hexadecanoico, por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas.

Vale ressaltar que a composição química dos vegetais pode apresentar variações de acordo com a altitude, época de colheita, sazonalidade, idade, clima, tipo de cultivo e processamento (LIN et al., 2003).

3.3 Separação e quantificação de compostos

Para a avaliação da atividade biológica de compostos naturais são necessárias etapas importantes promovidas para elucidar os compostos presentes na planta, sejam eles metabólitos primários e secundários, além de ensaios biológicos para comprovar a atividade de cada composto. Considerando que as plantas possuem inúmeros compostos distribuídos por todo o vegetal, para a identificação e quantificação são necessárias etapas de fracionamento, isolamento e purificação dessas substâncias. A etapa de fracionamento tem por objetivo separar compostos com base em suas características de solubilidade, polaridade e coeficiente de partição em diferentes solventes. Este procedimento baseia-se no grau de polaridade crescente dos solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol, principalmente (SIMÕES et al., 2016).

Após o fracionamento, a etapa seguinte deve contemplar o isolamento dos compostos realizado por cromatografia. As principais técnicas de cromatografia existentes são cromatografia planar em coluna aberta, cromatografia em papel e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A técnica mais utilizada para separação de compostos é a CLAE, pois além de promover a separação de

compostos em uma matriz complexa, permite ao mesmo tempo sua quantificação. Além disso, este ensaio permite a utilização de diversos detectores, entre eles ultravioleta e arranjo de diodos, fluorescência, índice de refração, detector evaporativo com espalhamento de luz (ELSD) entre outros, utilizados para quantificar compostos com características químicas e moleculares diferenciadas (MEYER, 2013).

Um avanço no universo analítico que vale a pena salientar, é o surgimento da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE), que diferente da CLAE, emprega como fase estacionária partículas com tamanho inferior a 2 μm , o que proporciona uma alta capacidade de resolução em análises de misturas complexas ou extratos vegetais, que por sua vez, são ricos em compostos estruturalmente semelhantes, como é o caso dos compostos fenólicos e flavonoides (SWARTZ, 2005).

No entanto, os avanços nas técnicas de quantificação e identificação de ativos não se limitam a cromatografia. O acoplamento ao espectrômetro de massas (EM) e a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) surgiram para facilitar a elucidação de estruturas complexas sem a necessidade de amostras de referência para comparação, ou seja, essas técnicas possibilitam a identificação completa de estruturas separadas e isoladas por cromatografia. Dessa maneira, a atividade biológica dos compostos presentes nas plantas pode ser associada a estruturas conhecidas, isoladas e identificadas de maneira mais assertiva (SCHRIPSEMA, 2010).

Outra alternativa muito utilizada para separação e quantificação de compostos é a Cromatografia Gasosa (CG). Esta técnica, por sua vez, possui algumas limitações e requisitos básicos para ser eficiente e atender ao que se propõe. De maneira geral, é uma técnica aplicada para a separação e análise de misturas cujos constituintes devem apresentar ponto de ebulição de até 300 $^{\circ}\text{C}$, ser termicamente estáveis e voláteis (LITTLEWOOD, 2013).

3.4 Propriedades antioxidantes

Antioxidantes são definidos como substância que, em baixas concentrações, retardam ou previnem a oxidação do substrato o qual entram em contato (HALLIWEL et al., 1995). Para classificar estes compostos quanto ao seu poder antioxidante, é necessário considerar pontos como a presença de substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio; capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; capacidade de quelar metais de transição durante o processo oxidativo e facilidade de acesso ao local de ação, que depende das características estruturais da molécula (hidrofobicidade e lipofilicidade) (MANACH et al., 2004).

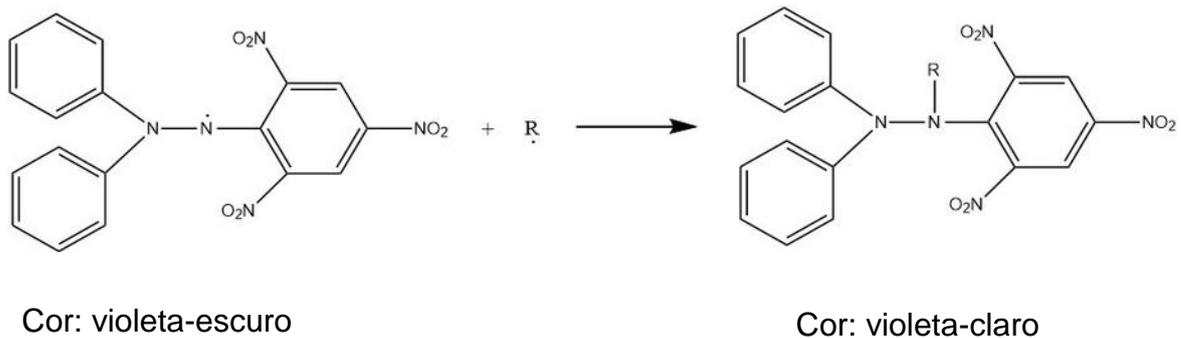
Em alimentos com elevado teor de ácidos graxos insaturados, a oxidação lipídica é inevitável e ocorre na presença de oxigênio, luz e temperatura por basicamente três processos, oxidação enzimática, fotoxidação e autooxidação (SOARES et al., 2012). Portanto, a adição de compostos antioxidantes é necessária para inibir e retardar a oxidação do produto, uma vez que esses compostos atuam estabilizando os ácidos graxos mediante reação com radicais livres, quelando íons metálicos e interrompendo a fase de propagação da oxidação lipídica (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

Segundo Maqsood et al. (2014) frutas, vegetais, sementes de frutas, cereais, bagas, vinho, chá, azeite e plantas aromáticas são fontes naturais de compostos antioxidantes, dentre eles a vitamina C, tocoferóis, carotenoides e flavonoides. Roleira et al. (2015) realizaram levantamento dos alimentos de origem vegetal que possuem compostos fenólicos com atividade antioxidante e efeitos benéficos a saúde contra processos carcinogênicos, e apontaram a maçã (catequina, procianidinas (B1 e B2), cloridzina e epicatequina), sementes de uva (catequinas, ácido galico, cafeína e ácido ferulico), batata (ácido clorogênico, catequina, cafeína, ácido sinapico e ferulico), soja (daidzina, genistina, daidzina, genistina), farinha de trigo (ácido ferulico, alta tocoferol, ácido p-cumarico); mel (crisina) e propolis verde (artepillin C, quercetina, kaempferol, ácido p-cumarico) como exemplos de alimentos ricos em antioxidantes.

3.4.1 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante dos compostos pode ser executada por métodos simples e confiáveis como o método de DPPH (difênil-1-picrilhidrazila) e FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power - poder antioxidante de redução do ferro). O método DPPH envolve a reação de oxido-redução do radical livre 2,2-difênil-1-picrilhidrazila e a espécie antioxidante presente no meio. Inicialmente o DPPH apresenta uma coloração púrpura/violeta, que após receber o átomo de hidrogênio proveniente da espécie antioxidante, torna-se violeta claro, podendo chegar a um tom levemente amarelado (BOROSKI et al., 2015), conforme demonstrado na Figura 3.

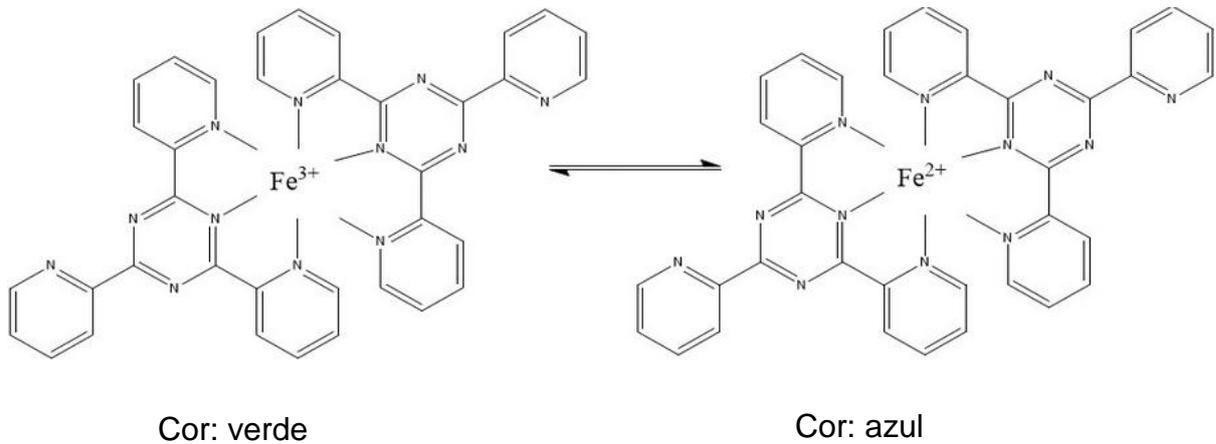
Figura 3 - Reação de oxido-redução do radical DPPH.



Fonte: BOROSKI et al., 2015.

Já o método de FRAP consiste na utilização do complexo férrico (2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$), formado por duas moléculas de 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) que atuam como ligantes, e um íon metálico central Fe^{3+} . Na presença de uma substância antioxidante redutora, o complexo férrico recebe um elétron e é reduzido no complexo ferroso (2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$), conforme ilustra a Figura 4. Quando essa reação forma o complexo ferroso, desenvolve-se coloração azul com intensidade que varia de acordo com a concentração de antioxidante presente na amostra analisada (BOROSKI et al., 2015).

Figura 4- Reação do complexo férrico com o reagente de FRAP e o antioxidante.



Fonte: BOROSKI et al., 2015.

A atividade antioxidante desempenhada por extratos vegetais é atribuída a algumas estruturas químicas específicas, dentre elas estão os compostos fenólicos. Estes compostos são abundantes na natureza, com mais de 8000 estruturas já detectadas em plantas, que por sua vez desempenham papel importante no crescimento e reprodução das espécies, além de promoverem a pigmentação e proteção do vegetal (SHAHIDI e NACZK, 1995; SILVA et al., 2010).

3.4.2 Compostos fenólicos

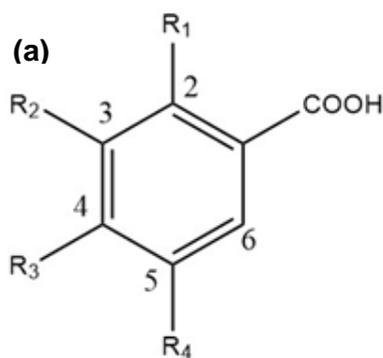
A estrutura química dos compostos fenólicos é caracterizada por possuir um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Devido a variedade de combinações que ocorrem na natureza esses compostos compreendem uma grande diversidade dos chamados polifenóis, entre eles os flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e ácidos fenólicos (ácido benzoico, cinâmico e seus derivados) (KING, 1999; LEE et al., 2005; SILVA, COSTA, SANTANA e KOBLITZ, 2010).

Suas estruturas moleculares lhes garantem atividade antioxidante expressiva que pode ocorrer por diferentes mecanismos, classificados em primário e secundário. O mecanismo antioxidante primário atua interrompendo a cadeia de

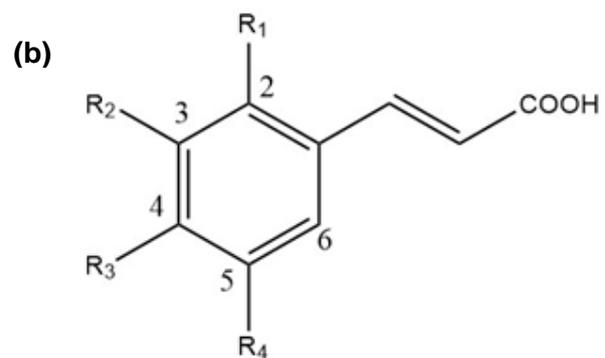
reação doando aos radicais livres elétrons ou hidrogênio, formando complexos lipídico-antioxidante. Os antioxidantes de mecanismo secundário podem atuar na complexação de metais, sequestro de oxigênio, absorção de radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (ADEGOKE et al., 1998).

O grupo mais importante dos compostos fenólicos são os flavonoides e os mais simples são os derivados do ácido fenólico, que contemplam os ácidos benzoico e cinâmico (Figura 5). Os ácidos hidroxicinâmicos são antioxidantes mais efetivos do que os ácidos hidroxibenzoicos. O poder antioxidante está relacionado a porção ácida do composto e o número de pontos relativos dos grupos hidroxil na estrutura do anel aromático (DE BEER et al., 2002). Como pode ser observado na Tabela 1, tanto o ácido hidroxibenzoico quanto o ácido hidroxicinâmico são grupos que englobam várias moléculas, que se diferenciam pela posição dos radicais no anel básico.

Figura 5 - Estruturas moleculares do ácido benzoico (a) e ácido hidroxicinâmico (b).



Ácido hidroxibenzoico



Ácido hidroxicinâmico

Fonte: DE BEER et al. 2002.

Tabela 1 – Principais representantes dos ácidos fenólicos e posição de substituição na estrutura base que diferenciam cada um dos compostos.

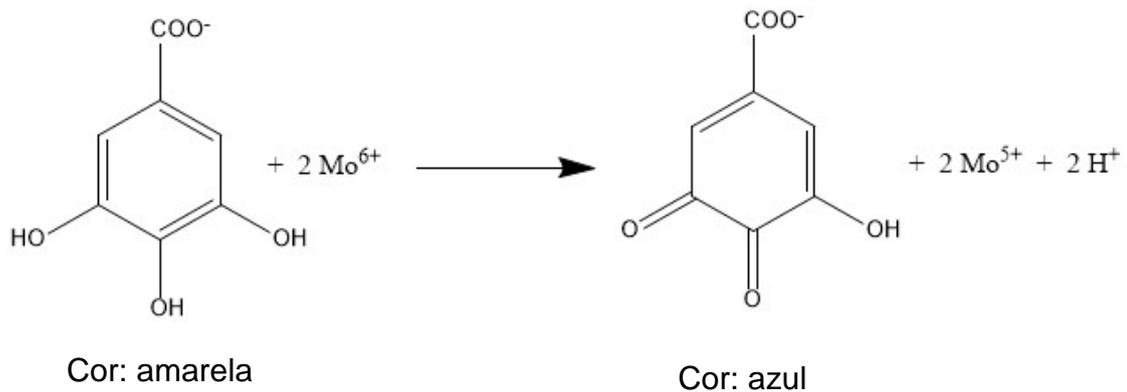
Compostos	2	3	4	5	6
ácido hidroxibenzoico					
ácido salicílico	OH	H	H	H	H
ácido m-hidroxibenzoico	H	OH	H	H	H
ácido p-hidroxibenzoico	H	H	OH	H	H
ácido protocatecuico	H	OH	OH	H	H
ácido gálico	H	OH	OH	OH	H
ácido vanílico	H	O-ME	OH	H	H
ácido siríngico	H	O-ME	OH	O-ME	H
ácido hidroxicinâmico					
ácido p-cumarico	H	H	OH	H	H
ácido cafeico	H	OH	OH	H	H
ácido ferrulico	H	O-ME	OH	H	H
ácido sinápico	H	O-ME	OH	O-ME	H

* os números 2, 3, 4, 5 e 6 referem-se ao a posição do carbono onde há a substituição do radical; O-ME (oxigênio e grupo metil).

Fonte: DE BEER et al. 2002.

Para a quantificação dos compostos fenólicos existem métodos por espectrofotometria, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência. O ensaio mais utilizado para a quantificação destes compostos é o teste de Folin-Ciocalteu, método de fácil execução e boa reprodutibilidade, porém não específico, uma vez que não detecta compostos fenólicos de cada classe, e sim qualquer estrutura característica deste grupo. Baseia-se na reação de oxido-redução do reagente com o composto fenólico, que por sua vez forma espécies reduzidas denominados complexos de molibdênio-tungstênio (Figura 6), que desenvolve uma coloração azul. A intensidade da cor é proporcional ao número de hidroxilas ou grupos potencialmente oxidáveis presentes na estrutura avaliada (BOROSKI et al., 2015).

Figura 6 - Reação dos compostos fenólicos com reagente de Folin Ciocalteu.



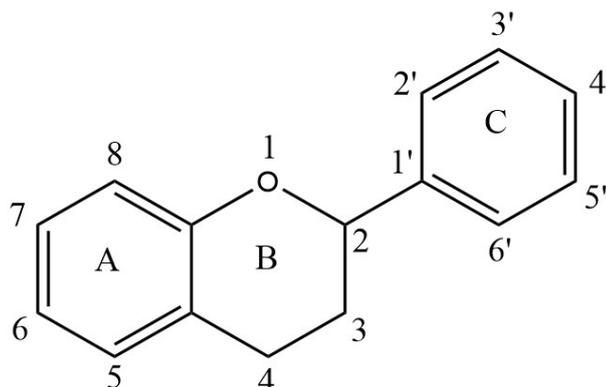
Fonte: DE BEER et al. 2002.

3.4.3 Flavonoides

Dentro da classe dos compostos fenólicos estão os flavonoides, que representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal. Sua descoberta se iniciou em 1930, quando uma nova substância foi isolada das laranjas, a qual acreditava-se na época, ser um membro de uma nova classe de vitaminas, designado vitamina P. Mais tarde, tornou-se claro que essa substância se referia a rutina, uma molécula pertencente a classe dos flavonoides. Até agora mais de 4000 moléculas de flavonoides foram identificadas e estão amplamente distribuídas no reino vegetal (MIDDLETON, 1998).

Nos alimentos os flavonoides são geralmente responsáveis pela cor, sabor, prevenção da oxidação da gordura e proteção de vitaminas e enzimas (YAO, JIANG e SHIETAL, 2004). Sua estrutura química (Figura 7) consiste em dois anéis aromáticos característicos denominados anel A, derivado do ciclo acetato/malonato, e o anel B, proveniente da fenilalanina, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (MERKEN e BEECHER, 2000).

Figura 7 - Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: KUMAR e PANDEY, 2013.

Os principais grupos de flavonoides são os flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, flavononóis e isoflavonas, que se diferem no nível de oxidação e padrão de substituição do anel C. Dentro de cada um desses grupos há diferentes compostos que se diferenciam entre si por substituição dos anéis A e B, conforme exposto na Tabela 2 (KUMAR e PANDEY, 2013).

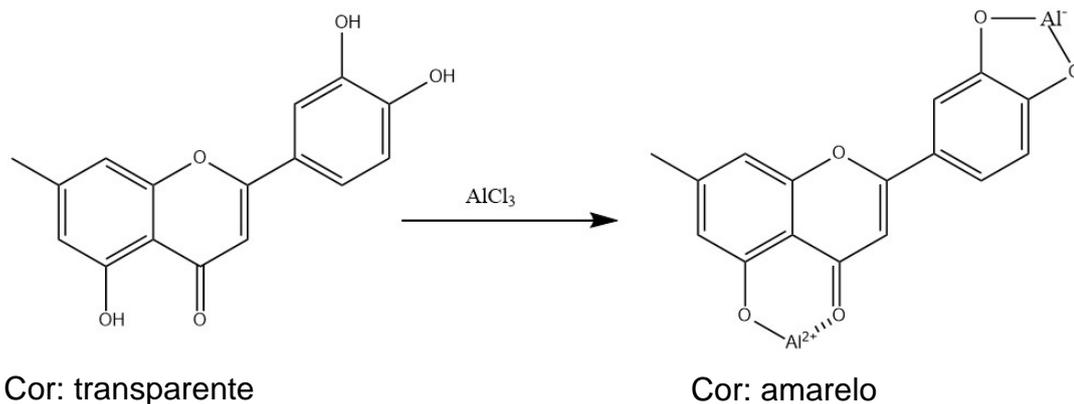
Tabela 2 – Principais representantes dos flavonoides e posição de substituição na estrutura base que diferenciam cada um dos grupos.

Grupo	Flavonoides	Substituição				
		5	6	7	3	4
Flavanona	Eriodictiol	OH	H	OH	OH	OH
	Hesperitina	OH	H	OH	OH	O-ME
	Naringenina	OH	H	OH	H	OH
Flavanol	Catequina	OH	H	OH	OH	OH
	Galocatequina	OH	H	OH	OH	OH
Flavona	Apigenina	OH	H	OH	H	OH
	Cristina	H	H	OH	H	H
	Leteolina	OH	H	OH	OH	OH
Flavonol	Kamferol	OH	H	OH	H	OH
	Miricetina	OH	H	OH	OH	OH
Flavononol	Quercetina	OH	H	OH	OH	OH
	Taxifolina	OH	H	OH	OH	OH
	Daidazina	H	H	OH	H	OH
Isoflavona	Genistéina	OH	H	OH	H	OH
	Gliceteína	OH	O-ME	OH	H	OH
	Formononetina	H	H	OH	H	O-ME

* os números 2, 3, 4, 5 e 6 referem-se ao a posição do carbono onde há a substituição do radical.; O-ME (oxigênio e grupo metil). Fonte: KUMAR, 2013.

Os métodos utilizados para a quantificação de flavonoides totais baseiam-se na reação de complexação do composto avaliado com o metal alumínio, formando um complexo colorido (amarelo) e estável em metanol acidificado (Figura 8). Por não ser um método específico, a determinação dos flavonoides pode englobar várias classes diferentes deste grupo (BOROSKI et al., 2015).

Figura 8 - Formação do complexo flavonoide e alumínio



Fonte: BOROSKI et al. 2015.

3.5 Propriedades antimicrobianas

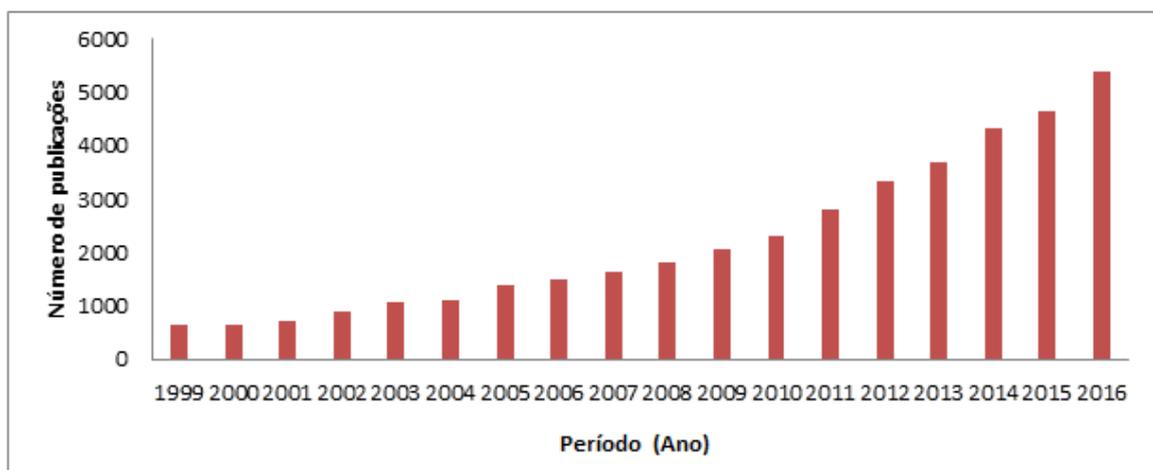
Desde a antiguidade, as plantas têm sido utilizadas por várias comunidades para tratar uma grande quantidade de doenças, incluindo as infecções. Numerosos estudos sobre a farmacologia das plantas medicinais foram realizados com a perspectiva de reduzir os custos e melhorar a qualidade do tratamento já que estas constituem uma fonte potencial para a produção de novos medicamentos ou podem aumentar os efeitos dos antimicrobianos convencionais (SILVA e FERNANDES JÚNIOR, 2010).

Grande parte dos alimentos de origem vegetal ou animal possuem um tempo de vida útil reduzido, pois se deterioram com facilidade, o que acarreta uma redução na sua qualidade. A deterioração dos alimentos ocorrerem por inúmeros fatores, dentre eles o tipo de produto, a composição, formulação, embalagem e condição de estocagem. A principal forma de deterioração dos alimentos é de origem microbiana (MELO, SOARES e GOLÇALVES 2005). Para contornar este problema são aplicados aos alimentos substâncias com atividade conservante que impedem ou

retardam alterações provocadas pela ação de microrganismos, enzimas e/ou agentes físicos (HONORATO et al., 2014).

Avaliando o número de artigos publicados pelo Science Direct no período de 1999 a 2016, referente ao tema atividade antimicrobiana de plantas medicinais (Figura 9), pode-se verificar que o assunto tem despertado o interesse crescente por parte da comunidade científica dedicada à investigação das propriedades medicinais das plantas. Esse interesse se deve a busca de fontes alternativas e seguras para o controle de patógenos transmitidos principalmente pelos alimentos. A utilização desses produtos visa à produção mais econômica de antimicrobianos e a eliminação de microrganismos que adquiriram resistência a conservantes e antimicrobianos sintéticos (GYAWALI e IBRAHIM, 2014).

Figura 9 – Levantamento do número de artigos publicados no período de 1999 a 2016 referente ao tema de atividade antimicrobiana de plantas medicinais.



De acordo com Savoia (2012) os principais compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana promovida por espécies vegetais são os alcaloides, flavonoides, terpenos e os polifenóis. Sabe-se que as propriedades antibacterianas dos flavonoides provêm da capacidade de formar complexos tanto com proteínas extracelulares quanto solúveis, bem como com membranas bacterianas, que causam desestabilidade celular (COWAN, 1999; FOWLER et al., 2011).

3.5.1 Métodos de avaliação da atividade antimicrobiana

Existem várias técnicas para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, dentre elas técnica de difusão em ágar (poço e disco) e de microdiluição, também chamada de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Este último método tem sido mais utilizado, pois além de ser confiável e econômico, avalia um número maior de microrganismos e ativos, além de fornecer dados quantitativos (DE BONA et al., 2014). A CIM é realizada em microplaca de 96 poços que permite o teste de várias concentrações do extrato após sua diluição seriada, e consiste na determinação da concentração inibitória mínima do extrato capaz de inibir o crescimento de determinado microrganismo.

Além da técnica de concentração inibitória mínima, existe o método de *checkerboard*, que também é realizado em microplaca. Este, por sua vez, explora ainda mais o processo de microdiluição de ativos, pois permite a combinação de compostos e a avaliação da interação entre eles (WHITE et al., 1996; BONAPACE et al., 2000).

É importante salientar que devido a complexidade química dos extratos vegetais torna-se inviável relacionar atividade biológica a um único ativo isolado, uma vez que as plantas possuem inúmeros compostos que podem atuar sinergicamente ou antagonicamente entre si (BRUSOTTI et al., 2014).

3.6 Conservantes

A utilização de conservantes já é prática comum nas indústrias, seja alimentícia, cosmética ou farmacêutica, pois pretendem retardar a deterioração do produto, aumentar sua vida útil e manter suas características originais, garantindo assim que os mesmos atendam as expectativas e necessidades dos consumidores. O processo de conservação de alimentos pode ter efeitos indesejáveis a longo prazo, dependendo da substância e tempo de exposição dos consumidores ao conservante. Como consequência disso o número de alimentos frescos minimamente processados e altamente perecíveis surgiram no mercado,

conservados por processos físicos mais brandos, como utilização de temperatura e embalagem em atmosfera modificada (RAHMAN, 2007).

Há muitos anos conservantes químicos como ácido benzoico, ácido ascórbico, sorbatos, ácido propiônico, nitritos e parabenos são amplamente utilizados como agentes conservantes confiáveis, no que diz respeito ao controle microbiano nos alimentos (BRUL e COOTE, 1999). Outro conservante sintético muito utilizado em cosméticos, alimentos e na indústria farmacêutica é o butil hidroxianisol (BHA), que se caracteriza por sua excelente atividade antioxidante e modesta atividade antimicrobiana, com maior efeito contra fungos e bactérias gram positivas e menor atividade contra bactérias gram negativas (ROWE et al., 2012).

Entretanto, o emprego do BHA tem sido questionado quanto a sua toxicidade, pois possui efeito genotóxico causando danos ao estômago, cólon, bexiga e cérebro originando células neoplásicas quando exposto a longo prazo (POLÔNIO, 2010). De maneira geral as estruturas moleculares desses compostos sintéticos oferecem riscos a saúde dos consumidores e não satisfazem mais o conceito de alimentos “saudáveis”, conceito este que vem ganhando cada vez mais destaque e apelo pelos consumidores, que se tornaram mais exigentes e atentos aos aspectos relacionados a saúde alimentar (RAHMAN, 2007).

Neste cenário, surgem os conservantes naturais que podem desempenhar atividade conservante isolada ou associada a conservantes sintéticos de forma eficiente, atendendo as exigências do mercado e reduzindo efeitos colaterais promovidos pelos conservantes sintéticos (CAROCHO et al., 2014). Exemplos de compostos naturais com potencial atividade conservante são os terpenos e seus familiares, dentre eles o carvacrol, timol e mentol. O carvacrol é um fenol monoterpenoide, presente em grandes quantidades no orégano, que mesmo em baixas concentrações exerce excelente atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus sp.* (ULTEE e SMID, 2001; ULTEE, BENNIK e MOEZELAAR, 2002; NOSTRO et al., 2004; XU et al., 2008).

Os polissacarídeos naturais já são utilizados como aditivos alimentares e exercem efeitos positivos à saúde sem toxicidade relatada. A quitosana e seus derivados (extraídos das conchas de crustáceos) são utilizados nas indústrias

alimentar e farmacêutica e exercem efeitos antimicrobianos, antitumorais, anticancerígenos, anti-inflamatórios, antioxidantes dentre outros (XIA et al., 2011).

3.7 Aplicação de insumos naturais em alimentos

O contato com produtos naturais é evidente desde o início da história humana, no entanto apenas no final do século XIX iniciaram-se estudos com o intuito de conhecer e comprovar as verdadeiras estruturas vegetais responsáveis pelas atividades biológicas observadas (KHAN e ABOURASHED 2011). Estes estudos tornaram a aplicação dos insumos naturais mais acertivas e específicas, uma vez que a resposta obtida já havia sido comprovada. Pesquisadores afirmam que os extratos vegetais, podem ser classificados como alternativas promissoras na substituição de conservantes de alimentos, graças a grande quantidade de compostos biologicamente ativos (WALLACE, 2004).

Em 2011, aproximadamente 250 plantas eram utilizadas em produtos alimentares comerciais como aditivo e aromatizante. A função desses aditivos é basicamente impedir o crescimento de microrganismos sem alterar as características organolépticas do produto e proteger o consumidor de alimentos contaminados que podem acarretar diversas patologias (CARDOSO et al., 2011). Além disso, retardam o processo de oxidação dos componentes lipídicos e deterioração do produto (SOARES et al., 2012). Resumidamente, a utilização de conservantes visa preservar as características sensoriais do produto, aumentar sua vida útil, reduzir perda econômicas com desperdícios e manter o alimento apto para consumo (SOUZA, LIMA E NARAIN, 2003).

Em levantamento realizado por Falowo et al. (2014) foi avaliada a estabilidade oxidativa de conservantes naturais com atividade antioxidante aplicados a diversos tipos de carnes e observaram que o orégano associado a folhas de sálvia apresentaram significativo decréscimo de oxidação lipídica por um período de 98 horas, quando estocados a 4°C na concentração de 0,2% de cada composto. O extrato de sementes de uva aplicado na concentração de 1,0% à carne cozida mantida sob refrigeração a 4°C obtiveram estabilidade oxidativa por 9 dias. O alecrim empregado na concentração de 0,1% em fígado de porco (a 4°C) apresentou

decréscimo da oxidação de proteínas por 90 dias e a casca de pinho a 1,0% inserida a carne de porco e mantida a 4°C obteve um decréscimo de oxidação lipídica por até 12 dias.

Portanto, a busca por substâncias naturais com atividade conservante tem sido cada vez mais explorada pelo mercado, com o intuito de substituir conservantes sintéticos com potencial tóxico utilizados na indústria alimentar, incorporar propriedades funcionais e bioativas e tornar os alimentos seguros e saudáveis para consumo. Além disso, incorporação de insumos naturais pode incrementar as características organolépticas do produto, torna-lo mais atrativo para o consumidor, que tem se preocupado cada vez mais com uma melhor qualidade de vida (HYGREEVA, PANDEY e RADHAKRISHNA., 2014; CAMPÊLO, 2016).

4 REFERÊNCIAS

ADEGOKE, G. O.; VIJAY K. M.; GOPALA, K. A. G.; VARADARAJ, M. C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B. R. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal Food Science Technology**, v. 35, n. 4, p. 283-298, 1998.

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

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kooga, p. 545, 2008.

BERTÉ, K. A. S.; BEUXT, 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." **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5523-5527, 2011.

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

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; DE MORAIS, D. R. Antioxidantes – **Princípios e métodos analíticos**. Curitiba. Ed. Appris, p. 49 – 101, 2015.

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

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

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

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

CAMPÊLO, M. C. da S. **Uso de conservadores naturais na elaboração de carne de sol com teores reduzidos de cloreto de sódio**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Semi-Árido. 2016.

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

CROCETTI, Z. S. **Formação sócio espacial do Paraná**. (Dissertação Doutorado em Geografia). UFSC. Santa Catarina. 2012.

DE BEER, D.; JOUBERT, E.; GELDERBLOM, W. C. A.; MANLEY, M. Phenolic compounds: A review of their possible role as in vivo antioxidants of wine. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 23, n. 2, p. 48-61, 2002.

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

DE RESENDE, M. D. V.; STURION, J. A.; CARVALHO, A. P.; SIMEÃO, R. M.; FERNANDES, J. S. C. Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa-Resultados da avaliação genética de populações, progênes, indivíduos e clones. **Embrapa Florestas**, 2000.

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

DUTRA, R. L. C.; FARIA, I. F. Reserva de Desenvolvimento Sustentável enquanto instrumento de gestão rural no Amazonas: viabilidade, importância e desafios. **Anais do XIX Encontro Nacional de Geografia Agrária, São Paulo**, p. 1-15, 2009.

FERNANDES, C. E. F.; SCAPINELLO, J. BOHN, A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; MAGRO, J. D.; PALLIGA, M. OLIVEIRA, J. V.; TRES, M. V. Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from erva-mate (*Ilex paraguariensis*) fruit using compressed propane and supercritical CO₂. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 1, p. 98-104, 2017.

FILIP, R.; LOPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**. v. 72, n. 7, p. 774-778, 2001.

FONSECA, M.C.M. Epamig pesquisa, produção de Plantas Medicinais para Aplicação no SUS. **Espaço para o produtor**, Viçosa, 2012.

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

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

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

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

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

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

HYGREEVA, D.; PANDEY, M. C.; RADHAKRISHNA, K. Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products. **Meat science**, v. 98, n. 1, p. 47-57, 2014.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção agrícola municipal : culturas temporárias e permanentes, ano base 2014, v. 41. 2015. 100 p. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 25 de julho de 2017.

ITO, E. A.; CROZIER, H. A. Theophylline metabolismo in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1336, n. 2, p. 323 - 230, 1997.

JACQUES, R. A.; KRAUSE, L. C.; FREITAS LDOS, S.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V.; CARAMAO, E. B. Influence of drying methods and agronomic variables on the chemical composition of mate tea leaves (Ilex paraguariensis A. St.-Hil) obtained from high-pressure CO2 extraction. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 25, p. 10081-10085, 2007

KHAN, I. A.; ABOURASHED, E. A. **Leung's encyclopedia of common natural ingredients: used in food, drugs and cosmetics**. John Wiley & Sons, 2011.

KING A, Y. G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **The Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206 – 220, 2005.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1 – 16, 2013.

LEE S.J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K.G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LEISTNER, L.; GORRIS, L.G. M. Food preservation by hurdle technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 2, p. 41-46, 1995.

LIN, S. H.; KIANG, C. D. Combined physical, chemical and biological treatments of wastewater containing organics from a semiconductor plant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 97, n. 1, p. 159-171, 2003.

LITTLEWOOD, Anthony Blair. **Gas chromatography: principles, techniques, and applications**. Elsevier, 2013.

MACIEL, M. A. M.; GOMES, F. E. S.; PINTO, A. C.; MAGALHÃES, S. S. S.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Aspectos sobre produtos naturais na descoberta de novos agentes antitumorais e antimutagênicos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 3, n. 1, p 38 – 59, 2013.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND C.; REMESY C.; JIMENEZ L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MAQSOOD, S.; BENJAKUL, S.; ABUSHELAIBI, A.; ALAM, A. Phenolic compounds and plant phenolic extracts as natural antioxidants in prevention of lipid oxidation in seafood: A detailed review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 6, p. 1125-1140, 2014.

MARTIN-FABER, R. **Herbário Herbar Phytotheque**. Disponível em: <https://phytotheque.wordpress.com/category/m/page/3/>>. Acesso em: 22 de maio. 2017.

MARTIN, J. G. P.; PORTO, E.; ALENCAR, S. M de; GLÓRIA, E. M. de; CORRÊIA, C. B.; CABRAL, I. S. R. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 45, n. 2, p. 93-98, 2013.

MAZUCHOWSKI, J.Z.; RÜCKER, N. G. de A. Erva-Mate - Prospecção Tecnológica da Cadeia Produtiva. Documento Executivo. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. **Departamento de Economia Rural**, p.27, 1997.

MAZZAFERA, P. Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguariensis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, p. 49 – 151, 1994.

MELLO, N.R.; SOARES, N.F.F.; GONÇALVES, M.P.J. Nisina: Um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v.52, p.921-938, 2005.

MELLO, A. C. B.; FREITAS, R. J. S.; WASZCZYNSKYJ, N.; KOEHLER, H. S.; WILLE, G. M. F.; BERTÉ, K. S. "Bebida gaseificada de erva-mate verde." **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.27, n. 1, p. 19 – 26, 2009.

MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 493-500, 2007.

MERKEN, H. M.; BEECHER G. R. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.

MEYER, Veronika R. **Practical high-performance liquid chromatography**. John Wiley & Sons, 2013.

MIDDLETON JR, E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. In: **Flavonoids in the Living System**. Springer US, p. 175-182, 1998.

NAKAMURA, K. L. **Variabilidade genética e métodos de extração de metilxantinas e compostos fenólicos em erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hil.)**. Dissertação (Mestrado em biotecnologia aplicada à agricultura). Unipar. Umuarama. 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over de 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012;

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A. ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191-195, 2004.

PAGLIOSA, C. M. **Caracterização química do resíduo de ervais e folhas “in natura” de erva mate (Ilex paraguariensis A. St. Hil.)**. Dissertação (Mestrado em ciência dos alimentos). UFSC, Florianópolis. 2009.

PEREIRA, R. J.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146 – 152, 2012.

PIMENTEL, I. C.; KUCZKOWSU, F. R.; CHIME, M. A.; AUER, G. C.; JUNIOR, A. G. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (Ilex paraguariensis A. St.-Hil.). **Floresta**, v. 36, n. 1, p.123 – 128, 2006.

POLÔNIO, M. L. T. **Percepção de mães quanto aos riscos à saúde de seus filhos em relação ao consumo de aditivos alimentares: o caso dos pré-escolares do Município de Mesquita**. Tese (Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2010.

RAHMAN, M. S. (Ed.). **Handbook of Food Preservation**. CRC press, 2007.

ROLEIRA, F. M. F.; TAVARES-DA-SILVA, E.; VARELA, C. L.; COSTA, S. C.; SILVA, T.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, v. 183, p. 235-258, 2015.

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

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

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

SCHRIPSEMA, J. Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. **Phytochemical Analysis**. v. 21, n. 1, p. 14-21, 2010.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food Phenolics: source, chemistry, effects and applications. **Technomic Publishing Company Lancaster PA**, p. 3-39, 1995.

SHAKYA, Arvind Kumar. Medicinal plants: future source of new drugs. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 4, n. 4, p. 59-64, 2016.

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

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

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

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. Artmed Editora, 2016.

SOARES, D. J.; TAVARES, T. M.; BRASIL, I. M.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M. Processos oxidativos na fração lipídica de alimentos. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 263 - 272, 2012.

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

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

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. In: **Seminars in Immunology**. Academic Press, p. 3-9, 2004.

TOMAZZONI, M. I. **Subsídios para a introdução do uso de fitoterápicos na rede básica de saúde do município de Cascavel/PR**. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Paraná. 2004.

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

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

VALLI, M.; SANTOS, E. N. dos; FIGUEIRA, L. D.; NAKAJIMA, C. H.; CASTRO-GAMBOA, I.; ANDRICOPULO, A. D.; BOLZANI, V. S. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 3, p. 439-444, 2013.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. M.; FLOSS, P. A. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil): O Sabor. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p.415 – 420, 2002.

VIEIRA, M. A.; ROVARIS, A. A.; MARASCHIN, M.; SIMAS, K. N.; PAGLIOSA, C. M.; PODESTA, R. ANBONI, R. D. C.; BARRETO, P. L. M.; AMANTE, E. R. "Chemical characterization of candy made of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) residue." **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, n. 12, p. 4637-4642, 2008.

XIA, W.; LIU, P.; ZHANG, J.; CHEN, J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 2, p. 170-179, 2011.

XU, J.; ZHOU, F.; PEI, R-S.; XU, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 174-179, 2008.

YAO, L. H.; JIANG, Y.M.; SHIETAL, J. "Flavonoids in food and their health benefits," **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 113-122, 2004.

WALLACE, T. E. **Food Information Monitoring System**. U.S. Patent n. 6.817.757, 2004.

WHITE, R. L.; BURGESS, D. S.; MANDURU, M. BOSSO, J. A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914-1918, 1996.

WORLD HEALTH ORGANISATION. **National policy on traditional medicine and regulatory herbal medicines.** Report of a global survey. Génova: World Health Organisation; 2005.

CAPITULO 1

ATIVIDADE BIOLÓGICA E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM EXTRATO DE ERVA MATE E SUA APLICAÇÃO EM HAMBÚRGUER DE PEIXE

RESUMO

Há milênios as plantas são fontes naturais de substâncias utilizadas na indústria. Um exemplo dessas plantas é a erva mate, que por sua vez contém elevado conteúdo de compostos biologicamente ativos com potencial aplicação industrial. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade biológica do extrato de erva mate, quantificar seus compostos e aplicar em hambúrguer de peixe. O extrato seco de erva mate foi submetido a dois testes diferentes para avaliação da atividade antioxidante. No teste de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) foram observados resultados de IC₅₀ de 7,91 µg mL⁻¹ para o extrato de erva mate (EEM) e 1,04 µg mL⁻¹ para o butil hidroxianisol (BHA). Já para o teste de FRAP (ferric reducing antioxidant power – poder antioxidante de redução do ferro) os resultados de poder de redução de Fe (II) por grama de amostra foram de 4922,67 para EEM e 15801,14 para BHA. A investigação do poder antioxidante da combinação de erva mate e BHA foi realizada por planejamento experimental pelo teste de DPPH, no qual os resultados obtidos nos permite prever a resposta de cada composto em concentrações pré-determinadas. A avaliação da atividade antimicrobiana foi avaliada isoladamente pelo teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e em combinação pela técnica de *checkerboard*. Os resultados obtidos de CIM para o EEM frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Typhi*. foram de 10 mg mL⁻¹, 5 mg mL⁻¹ e 10 mg mL⁻¹, respectivamente, e para o BHA foi de 0,313 mg mL⁻¹ para todos os microrganismos testados. Quanto à análise de interação da combinação dos compostos observou-se atividade aditiva, de acordo com o valor de ICIF calculado que foi de 0,998 para *S. aureus*. A metodologia desenvolvida para a quantificação dos compostos da erva mate por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) se mostrou específica, linear, precisa e exata. Os resultados da quantificação dos compostos por CLUE foram de 49,6 mg g⁻¹ de ácido clorogênico, 34,5 mg g⁻¹ de cafeína e 23,1 mg g⁻¹ de rutina. Por fim, foram preparados os hambúrgueres de peixe e realizadas as análises de composição centesimal, oxidação lipídica e microbiológica. Não foi observada oxidação lipídica no produto. Quanto à análise microbiológica de contagem de mesófilos no hambúrguer de peixe foi observado diferença estatística entre a formulação controle e as formulações com BHA e extrato de erva mate a 1,0%. Contudo, estudos adicionais utilizando a erva mate devem ser realizados para comprovar seu efetivo poder conservante.

Palavras chave: Antioxidante. Antimicrobiano. Checkerboard. Conservante. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência. Butil hidroxianisol.

ABSTRACT

BIOLOGICAL ACTIVITY AND QUANTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN MATE HERB EXTRACT AND ITS APPLICATION IN FISH HAMBURGER

For thousand of years, plants have been natural sources of substances used in industry. An example of such plants is yerba mate, which in turn contains high content of biologically active compounds with potential industrial application. This paper aimed to assess the biological activity of yerba mate extract, to quantify its compounds and to apply in fish hamburger. The yerba mate dry extract was submitted to two different assays in order to evaluate the antioxidant activity. In the DPPH assay, IC_{50} results of $7.91 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the yerba mate extract (YME) and $1.04 \mu\text{g mL}^{-1}$ for butyl hydroxyanisole (BHA) were observed. For the FRAP assay, the results of Fe (II) reduction per gram of sample were 4922.67 for YME and 15801.14 for BHA. The research of the antioxidant power of the combination of yerba mate and BHA was carried out by experimental design by the DPPH assay, in which the obtained results allow us to predict the response of each compound at predetermined concentrations. The assessment of the antimicrobial activity was carried out in isolation by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assay and in combination with the *checkerboard* technique. The results obtained from MIC for YME against *E.coli*, *S. aureus* and *Salmonella* sp. were 10 mg mL^{-1} , 5 mg mL^{-1} and 10 mg mL^{-1} , respectively, and for BHA was 0.313 mg mL^{-1} for all assessed microorganisms. In regard to the interaction analysis of the compound combination, additive activity was observed, according to the calculated FIC index value of 0.998 for *S. aureus*. The methodology developed for the quantification of yerba mate compounds by ultra performance liquid chromatography (UPLC) was specific, linear, precise and accurate. The results of the compounds quantification by UHPLC were 49.6 mg g^{-1} of chlorogenic acid, 34.5 mg g^{-1} of caffeine and 23.1 mg g^{-1} of rutin. Finally, the fish hamburgers were prepared and the analyzes of centesimal composition, lipid and microbiological oxidation were carried out. No lipid oxidation was observed in the product. Regarding the microbiological analysis of mesophilic counts, statistic difference was observed between the control formulation and the formulations with BHA and 1.0% yerba mate extract. However, additional studies using yerba mate should be performed to prove its effective preservative power.

Keywords: Antioxidant. Antimicrobial. Checkerboard. Preservative. Liquid Chromatography of Ultra Efficiency. Butyl hydroxyanisole.

1 INTRODUÇÃO

Há milênios as plantas são fontes inspiradoras de produtos ou derivados com potenciais atividades biológicas, servindo como protótipos de moléculas biologicamente ativas sintetizadas para aplicação em larga escala na indústria. A utilização cem por cento natural dos compostos ativos extraídos das plantas geralmente é impraticável, graças ao seu baixo rendimento. Além disso, a complexidade dessas moléculas dificulta sua síntese completa e encarece o processo. Portanto, para viabilizar a utilização dessas substâncias foi necessário técnicas alternativas, como a semi-síntese dos compostos naturais, que tem como objetivo rearranjar moléculas naturais simples desprovidas de atividade para obter moléculas complexas biologicamente ativas (ATANASOV et al., 2015).

Os estudos de derivados vegetais não se limitam apenas a investigação de estrutura biologicamente ativa e processos de isolamentos dos compostos, mas também a sua aplicação à indústria, principalmente alimentícia, que tem causado interesse aos consumidores que procuram produtos de alta qualidade com propriedades nutricionais. A proposta de substituir conservantes sintéticos por naturais tornam o alimento mais seguro para consumo, além de atuar positivamente à saúde de seus consumidores. Portanto, nos últimos anos o interesse nas plantas tem focado em sua introdução em produtos alimentares com o intuito de otimizar sua vida útil, sem alterar significativamente suas características organolépticas ou nutricionais (TIWARI et al., 2009).

Um exemplo de planta que possui compostos biologicamente ativos é a erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hill), planta muito cultivada na América do Sul (Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai) chegando a aproximadamente 540.000 km² de área de cultivo (PAGLIOSA et al., 2010). É normalmente consumido na forma de mate, tererê e chá, e seu consumo no Brasil pode alcançar valores aproximados de 5 kg per capita por ano, na Argentina 6,5 kg/hab/ano e no Uruguai 10 kg/hab/ano, o que favorece a promoção de benefícios a saúde de seus consumidores (CARDOZO JUNIOR e MORANDI, 2016).

Numerosos compostos fitoquímicos ativos foram identificados na erva mate, responsáveis por diversas atividades biológicas. Entre eles, duas classes se

destacam, os polifenóis (ácido clorogênico) e xantinas (cafeína e teobromina), seguidos de alcalóides de purina (ácido cafeico, ácido 3,4-dicica-quinílico, ácido 3,5-dicicavelíquico), flavonoides (quercetina, kaempferol e rutina), aminoácidos, minerais (P, Fe e Ca) e vitaminas (C, B1 e B2) (POMILIO, TRAJTEMBERG e VITALE, 2002; ZAPOROZHETS et al., 2004). De acordo com Heck e Mejia (2007) a cafeína, rutina e a teobromina possuem atividade antioxidante, já o ácido clorogênico, além de potencial antioxidante, detém de propriedades antimicrobianas.

Considerando que a erva mate possui potencial antimicrobiano e antioxidante, atividades já desempenhadas por conservantes sintéticos em alimentos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade biológica e quantificar os compostos bioativos da erva mate, além aplicar seu extrato em hambúrguer de peixe para avaliar sua atividade conservante.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Material vegetal e butil hidroxianisol

O extrato seco de erva mate (lote A80916) foi gentilmente cedido pela empresa Heide Extratos Vegetais situada em Pinhais, PR. O mesmo foi preparado em solução hidroalcoólica e seco por spray dryer, cuja velocidade de secagem foi de 7L/hora com temperatura de entrada de 180°C e de saída de 90°C, sem a adição do veículo maltodextrina.

O conservante butil hidroxianisol (BHA - lote ABH015C010) foi adquirido da empresa Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos de Cambuci, SP.

2.2 Atividade antioxidante

Os testes para avaliação da atividade antioxidante do extrato e do BHA foram realizado pelos métodos de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrihidrazila (DPPH) e poder de redução do complexo férrico (FRAP).

O teste de DPPH se baseou no método descrito por Boroski et al. (2015), com adaptações, no qual foram transferidos 5, 10, 20 e 30 μL de uma solução amostra estoque diluída em metanol, para tubos de ensaios diferentes, e a cada um desses tubos foram adicionados 2 mL de DPPH a 0,119 mmol L^{-1} . As concentrações finais avaliadas, tanto do extrato de erva mate quanto do BHA, foram de 5, 10, 20 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após 30 minutos de reação, sob o abrigo da luz, foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro UV-VIS (PG instruments –T80+) a 517 nm, cujos resultados obtidos foram expressos por IC_{50} em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O teste de FRAP procedeu conforme descrito pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2016) com adaptações, em que foi preparada uma curva de calibração a partir do padrão de sulfato ferroso, nas concentrações que variaram de 500 a 2700 μM . Tanto o extrato quanto o BHA foram diluídos em metanol nas concentrações de 0,5, 0,25 e 0,125 mg mL^{-1} . Foram pipetados 0,09 mL da solução amostra, 0,27 mL de água e 2,7 mL do reagente de FRAP para tubo de ensaio devidamente protegido da luz. Após 30 minutos de reação em banho de água

a 37°C, as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro UV-VIS (PG instruments –T80+), a 595 nm, e os resultados obtidos foram expressos em concentração de extrato equivalente a μM de sulfato ferroso.

2.3 Quantificação de compostos fenólicos e flavonóides totais

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu (Boroski et al., 2015). Foi preparada uma curva de calibração a partir do padrão de ácido gálico (Vetec) nas concentrações que variaram de 0,025 a 0,20 mg mL^{-1} . Foram transferidos 0,25 mL da amostra ou padrão para tubo de ensaio, 0,25 mL de reagente de Folin Ciocalteu diluído (1:1), 0,5 mL de solução saturada de carbonato de sódio e 4 mL de água destilada, que após 25 minutos de reação ao abrigo da luz, foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm. A concentração analítica da amostra de extrato avaliada foi de 2,0 mg mL^{-1} em etanol, e os resultados foram obtidos pela avaliação das amostras em espectrofotômetro UV-VIS (PG instruments –T80+) a 725 nm, calculados através da equação da regressão linear da curva de calibração do ácido gálico, expressos em mg de equivalente de ácido gálico por g de extrato (EAG g^{-1}).

O teste de flavonoides totais também foi realizado segundo Boroski et al. (2015), em que a curva de calibração foi preparada com o padrão de quercetina (Sigma Aldrich) contemplando o intervalo de 0,01 a 0,1 mg mL^{-1} . O extrato foi diluído em etanol à concentração de 2,0 mg mL^{-1} , em que 0,5 mL dessa solução foi transferida para tubo de ensaio contendo 0,25 mL de solução de cloreto de alumínio a 5% e 4,25 mL de metanol. Após 30 minutos de reação (ao abrigo da luz) as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro UV-VIS (PG instruments –T80+) a 425 nm e os resultados de teor de flavonoides presentes no extrato foram calculados baseando-se na equação da reta obtida pela curva do padrão de quercetina e expressos em mg de equivalente a quercetina por g de extrato (mg EQ g^{-1}).

2.4 Atividade antimicrobiana do extrato de erva mate e BHA

A atividade antibacteriana do extrato seco de erva mate e do BHA foram testadas utilizando a metodologia da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição em microplacas, conforme CLSI (2015). Os microrganismos testados foram as bactérias *Salmonella enterica* sorovar Typhi (ATCC06539), *Staphylococcus aureus* (ATCC14458) e *Escherichia coli* (ATCC10536).

O experimento foi realizado em microplacas de 96 poços, que após as diluições seriadas do extrato e adição do inóculo (padronizado pela escala de Mcfarland a 0,5) a cada poço, foram incubadas a 36°C por 24 horas em estufa bacteriológica. Posterior a este período, foi aplicado a cada poço da microplaca 5 µL da solução de cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) a 0,5% e novamente as placas foram incubadas em estufa a 36°C por um período aproximado de 3 horas, facilitando assim a visualização dos resultados. Os poços onde se observou a coloração rosa indicava que houve crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato, em mg mL⁻¹, capaz de impedir o crescimento microbiano.

Para o teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram transferidas alíquotas de cada poço onde não foi observado crescimento visual (anterior à adição do corante CTT), para ágar Muller Hinton, na sequência as placas foram incubadas a 36°C por 24 horas. A CBM foi definida como a menor concentração do extrato em estudo capaz de causar a morte do inóculo.

2.5 Análise de interação antimicrobiana por *checkerboard*

O método de *checkerboard* consistiu na diluição seriada do BHA e extrato de erva mate em microplaca de 96 poços, conforme descrita por Endo et al. (2010), que resulta em combinações diferentes destes ativos. O cálculo de ICIF (Índice de Concentração Inibitória Fracionada) avalia e classifica a interação dos compostos, levando em consideração a concentração mínima inibitória do composto associado e isolado, conforme a seguinte fórmula:

$$ICIF = \frac{(CIM \text{ extrato na combinação})}{(CIM \text{ extrato})} + \frac{(CIM \text{ conservante na combinação})}{(CIM \text{ do conservante})}$$

Segundo Nogueira (2012), valores de ICIF $\leq 0,5$ caracteriza interação sinérgica entre os compostos; entre 0,5 e 1,0, interação aditiva; entre 1,0 e 2,0 interações indiferente e ICIF maior que 2,0 caracteriza interação antagônica entre os compostos.

2.6 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de compostos de erva mate por cromatografia líquida de ultra eficiência

O desenvolvimento do método analítico para avaliação de cafeína, quercetina, rutina e ácido clorogênico no extrato de erva mate foi realizado por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE). O cromatógrafo utilizado foi da marca Waters acquity H-class equipado com injetor, bomba quaternária, forno e detector. O software utilizado para análise de dados foi o Empower[®] 3. A separação cromatográfica foi realizada com coluna C18 (octadecilsilano) Waters Acquity BEH 100 mm x 2,1 mm x 1,7 μ m. A fase móvel foi composta de ácido trifluoracético 0,1% (TFA) e metanol, com gradiente de concentração que iniciou com 80% de TFA 0,1% e 20 % de metanol, em 1 minuto foi para 60% de TFA 0,1% e 40% de metanol, em 6 minutos 43% de TFA 0,1% e 57% de metanol, em 6,2 minutos retornou a condição inicial (80:20), no qual se manteve até 7 minutos.

As amostras foram preparadas na concentração de 100 μ g mL⁻¹ em água ultrapura e filtradas em membrana hidrofílica PVDF (polyvinylidene difluoride, que se refere ao material de difluoreto de polivinilideno) de abertura de poro de 0,22 μ m da marca Merck[®]. O Fluxo utilizado foi de 0,35 mL min⁻¹, temperatura da coluna de 45°C, temperatura do injetor de 5°C e volume de injeção de 3 μ L. O comprimento de onda de 254 nm.

A validação da metodologia analítica para a quantificação dos compostos contidos na erva mate foi realizada contemplando os parâmetros de especificidade,

linearidade, precisão, exatidão e robustez do método, conforme guia Q2 (R1) da Conferência Internacional de Harmonização (International Conference on Harmonisation, ICH) que aborda o procedimento de validação analítica (ICH, 2005).

2.7 Atividade antioxidante combinada (extrato de erva mate x BHA)

Foi proposto um planejamento experimental com 2 fatores, 3 repetições níveis, desenvolvido pelo software Design Expert versão 7.0, conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Contempla o planejamento experimental das diferentes concentrações de extrato de erva mate e BHA associados.

Amostra	A: extrato de erva mate ($\mu\text{g/mL}$)	B: BHA ($\mu\text{g/mL}$)
1	0	10
2	0	5
3	0	0
4	5	10
5	10	10
6	5	10
7	0	5
8	5	0
9	0	10
10	5	10
11	10	10
12	0	5
13	5	5
14	10	0
15	10	5
16	0	0
17	5	5
18	0	10
19	5	5
20	10	5
21	5	0
22	10	0
23	10	5
24	5	0
25	10	0
26	0	0
27	10	10

A metodologia experimental abordada para o teste citado foi a de redução do radical DPPH realizada em espectrofotômetro UV-Vis (PG instruments –T80+), no qual combinou-se diferentes concentrações de BHA e extrato de erva mate, que variaram de 0 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, preparadas em metanol. O procedimento analítico foi executado conforme métodos de DPPH, descrito anteriormente.

2.8 Aplicação do extrato de erva mate ao hambúrguer de peixe

O hambúrguer de peixe teve sua formulação base fundamentada no dossiê técnico apresentado por Guerreiro (2006), para preparo de hambúrgueres.

O filé de tilápia foi adquirido comercialmente na cidade de Toledo, PR e transportado em caixa térmica até a Fundação de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNDETEC) para preparo das formulações testes. Os insumos básicos utilizados foram sal (marca Cisne, lote 7013161229C), farinha de mandioca branca (marca Pinduca, lote 2P0011) e filé de tilápia (marca Pescados Sereia, lote: 02/01/2017). Os tratamentos diferiram entre si quanto a adição e concentração de extrato de erva mate (Heide Extratos Vegetais, lote A80916) e butil hidroxianisol (Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos, lote ABH015C010). As formulações foram elaboradas conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Formulações testadas para os hambúrgueres de peixe com e sem a adição do extrato de erva mate e BHA.

Ingredientes/ Formulações	Formulação 1	Formulação 2	Formulação 3	Formulação 4	Formulação 5
	% de cada insumo				
Tilápia	89,70	89,69	89,20	88,70	89,67
Sal	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Farinha	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Extrato	-	-	0,50	1,00	-
BHA	-	0,01	-	-	0,03

Para o preparo dos hambúrgueres de peixe foi utilizado equipamentos específicos, dentre eles o moedor de carnes (SCHARFEN, tipo TC11, modelo TC11) e a hamburgueira (Hamburgatrice automática Planus 2002). Após o preparo os hambúrgueres foram mantidos sob refrigeração a ± 5 °C por um período de 28 dias.

2.9 Análises físico-químicas

As análises de físico-químicas dos hambúrgueres foram realizadas em triplicata apenas no tempo zero, com exceção da umidade, que foi avaliada durante todo o período de armazenamento do produto.

Para a análise de umidade foram pesados aproximadamente 5 g de hambúrguer (previamente triturados) em cadinho de porcelana e secos de forma direta em estufa a 105 °C até peso constante (NOLLET, 2004).

A quantificação de cinzas foi determinada por gravimetria, onde 5 gramas do hambúrguer de peixe triturado foram transferidos para cadinhos de porcelana e incinerados em mufla a 550°C até obtenção de cinzas brancas (aproximadamente 4h) (NOLLET, 2004).

A proteína bruta foi quantificada mediante a determinação do nitrogênio total pelo método de Kjeldahl, conforme AOAC (2000), no qual a amostra passa pelo processo digestão com mistura digestora (sulfato de cobre, selenito de sódio e sulfato de sódio) e ácido sulfúrico. Após a digestão as amostras foram destiladas e quantificadas por titulometria com solução de HCl 0,1M. O fator de correção do ácido clorídrico utilizado foi de 1,0049.

O teor de lipídios foi determinado pela técnica de Soxhlet (Soxhlet, 1879), em que 2 gramas de amostra passam por extração com éter de petróleo à quente. Após o período (aproximadamente 8 horas) de extração foi realizada a secagem da amostra em estufa para posterior quantificação dos lipídios totais por pesagem direta do resíduo seco.

Os carboidratos totais foram estimados por diferença, diminuindo de 100% a somatória dos demais componentes determinados no hambúrguer.

2.10 Avaliação da oxidação lipídica

A avaliação da oxidação lipídica do hambúrguer de peixe foi realizada nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias por duas metodologias distintas: método de índice de peróxidos e método de quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, (Thiobarbituric Acid Reactive Substances ou TBARS).

A determinação do índice de peróxidos foi realizada de acordo com o método oficial de índice de peróxido da Sociedade Americana de Químicos Petrolíferos (AOCS, 2003), a qual expõe 5 g do alimento a uma mistura de ácido acético:clorofórmio (3:2) e solução saturada de iodeto de potássio a 10%. Após 5 minutos de reação foi adicionado o indicador de amido a 1% para que a amostra fosse titulada com tiosulfato de sódio a 0,1M. O resultado foi avaliado calculando o índice de peróxido em miliequivalentes de peróxido por kg de hambúrguer.

A oxidação lipídica das formulações foi determinada pelo método de TBARS, que consiste na complexação do malonaldeído com duas moléculas de TBA (ácido tiobarbitúrico), promovendo o surgimento da coloração vermelha/rósea. Para o desenvolvimento do teste foi utilizado 10 gramas de amostra diluída em ácido tricloroacético 7,5 %, que após reação com a solução de TBA 0,02 M por 10 minutos em banho de água a 95 °C foi avaliada em espectrofotômetro UV-VIS (PG instruments –T80+) a 532 nm. A curva padrão foi preparada a partir do tetraetoxipropano (TEP) nas concentrações que variaram de 0 a 0,00135 M e os resultados foram expressos em mg de malonaldeído kg⁻¹ de hambúrguer (ZHANG, 2011).

2.11 Análises microbiológicas do hambúrguer de peixe

Foram realizadas as análises microbiológicas no hambúrguer de peixe nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias, previstas por legislação para produtos à base de pescado refrigerados ou congelados (hambúrgueres e similares), de acordo com a RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), que preconiza análise de coliformes a 45°C, Estafilococos coagulase positiva e *Salmonella sp.* Paralelamente

as análises exigidas por legislação foi realizada a análise de contagem de mesófilos, com o intuito de complementar a análise microbiológica do alimento.

Os métodos microbiológicos foram realizados conforme Manual Analítico Bacteriológico (Bacteriological Analytical Manual) do FDA (Food and Drug Administration) com adaptações (FDA, 1998).

2.12 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o sistema estatístico Action Stat versão 3.1 e Design expert versão 7.0. Os testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e de estatística inferencial (teste de Tukey e ANOVA) foram aplicados nos resultados das análises cromatográficas, quantificação de compostos fenólicos, flavonoides totais, atividade antioxidante realizadas no extrato de erva mate, e nos resultados obtidos das análises físico-químicas e microbiológicas dos hambúrgueres.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade antioxidante e quantificação de fenólicos totais e flavonoides

A Tabela 5 apresenta os resultados de atividade antioxidante do extrato de erva mate e do BHA, avaliada pelos métodos de DPPH e FRAP, além dos resultados da quantificação de fenólicos totais e flavonoides.

Tabela 5 - Resultados de DPPH, FRAP, fenólicos totais e flavonoides avaliados no extrato de erva mate e no BHA.

	DPPH (IC ₅₀ em µg mL ⁻¹)	FRAP (µmol de Fe (II) g ⁻¹) ¹	Fenólicos totais (EAG g ⁻¹) ²	Flavonoides (EQ g ⁻¹) ³
Erva mate	7,91 ± 0,06	4922,67 ± 23,17	104,54 ± 0,00	23,11 ± 0,01
BHA	1,04 ± 0,26	15801,14 ± 41,87	-	-

¹ µmol de Fe (II) g⁻¹: poder de redução em µmol de Fe (II) por grama de amostra; ² EAG g⁻¹: Equivalente a ácido gálico por grama de amostra; ³ EQ g⁻¹: Equivalente a quercetina por grama de amostra.

O método de DPPH expressou seu resultado por IC₅₀ em µg mL⁻¹, o qual se refere a concentração de ativo necessária para inibir 50% do radical DPPH utilizado no teste (NEELAMBIKA e LEELAVATHI, 2015). Verifica-se na Tabela 5 que o BHA possui uma atividade antioxidante aproximadamente oito vezes superior ao extrato de erva mate, uma vez que quanto menor a quantidade de ativo necessária para inibir 50% do radical DPPH, maior seu poder antioxidante. O BHA é um composto frequentemente utilizado na indústria devido ao seu alto poder antioxidante, portanto, o mesmo foi utilizado como padrão de comparação frente ao extrato de erva mate avaliado (SARKAR et al., 2015).

Berté et al. (2011) avaliaram a atividade antioxidante do extrato aquoso de erva mate seco por spray dryer e obtiveram valores de IC₅₀ igual a 2,52 mg mL⁻¹, o que demonstra uma baixa atividade antioxidante. Outro trabalho que avaliou a atividade antioxidante da erva mate por DPPH foi realizado por Huang et al. (2014), no qual o resultado de IC₅₀ do seu extrato aquoso foi de 413 µg mL⁻¹. De acordo com o mesmo autor os diferentes solventes utilizados para extração dos compostos, tempo de contato, processo de secagem e época de colheita interferem na

composição final do extrato e conseqüentemente na atividade biológica por ele desempenhada, fato que pode justificar as diferenças apresentadas.

No teste de quantificação do poder de redução de sulfato ferroso por FRAP, os resultados obtidos para o extrato de erva mate e BHA foram de 4922,67 e 15801,14 $\mu\text{mol de Fe(II) g}^{-1}$ de amostra, respectivamente, o que comprova o alto poder antioxidante do BHA visto que 1 grama do ativo é capaz de se complexar com 15801,14 $\mu\text{mol de Fe(III) a Fe(II)}$. Vale ressaltar que o extrato de erva mate apresentou um efeito antioxidante apenas três vezes inferior ao conservante sintético, o que pode ser considerado um bom resultado, uma vez que o extrato de erva mate é composto por uma mistura de substâncias ativas e inativas (MIRANDA et al., 2015).

O mecanismo de ação dos antioxidantes sintéticos, como o BHA, se deve a sua estrutura fenólica que permite a doação de um próton a um radical livre da molécula, o que ocasiona a interrupção do processo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres, que por sua vez, podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação (KUMAR, 2011). Já a atividade antioxidante de extratos vegetais se deve a presença de compostos fenólicos, moléculas capazes de doar radicais de hidrogênio para parear com outros radicais livres disponíveis, retardando a oxidação e estabilizando o sistema (DE BEER et al., 2002).

Quanto a quantidade de compostos fenólicos totais o extrato apresentou cerca de 104,54 mg equivalente a ácido gálico por grama de amostra (EAG g^{-1}). Sabe-se que os flavonoides pertencem a classe dos compostos fenólicos (MIDDLETON, 1998), portanto, dentro das 104,54 mg de compostos fenólicos determinados no extrato de erva mate, 23,11 mg correspondem a flavonoides totais, expresso em equivalente a quercetina por grama de amostra (EQG g^{-1}).

Resultados distintos foram obtidos por Oh et al. (2013) em análise de chás das folhas verdes de erva mate, no qual observaram resultados de 27,93 mg EAG g^{-1} do chá extraído em água e 66,86 EAG g^{-1} do chá extraídos em etanol. Nota-se que a extração dos compostos fenólicos foi mais eficiente quando extraídos em etanol, o que corrobora com o mencionado anteriormente por Huang et al. (2014), ou

seja, diferentes solventes podem extrair diferentes compostos, depende da polaridade das moléculas presente no extrato.

Valerga, Reta e Lanari (2012), avaliaram as folhas da erva mate frescas e secas e obtiveram resultados para compostos fenólicos de 4,15 mg e 96,07 mg EAG g⁻¹, respectivamente. Observa-se que os resultados obtidos para as folhas secas estão próximos dos obtidos no presente trabalho, porém diferentes do obtido na folha fresca. Isso se deve, provavelmente, a grande quantidade de água presente na folha fresca, que interfere diretamente na massa pesada e no resultado final da quantidade de fenólicos totais.

Sabe-se que os compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides, são responsáveis por promover a atividade antioxidante, graças as suas propriedades de óxido-redução que neutralizam os radicais livres presentes no meio (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). A partir disso, pode-se associar a presença destes compostos no extrato de erva mate avaliado com os resultados obtidos de atividade antioxidante.

3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados obtidos no ensaio de concentração inibitória mínima para a erva mate foram de 10 mg mL⁻¹ para *Escherichia coli* e *Salmonella Typhi*, e de 5 mg mL⁻¹ para *Staphylococcus aureus*. O BHA apresenta valores de CIM de 0,313 mg mL⁻¹ para os três microrganismos testados.

Diferentes resultados foram obtidos por Marin et al. (2013) em estudo que avaliou o extrato metanólico (M) e etanólico (E) da erva mate e obtiveram resultados de CIM de 1,56 mg mL⁻¹ (M) e 0,78 mg mL⁻¹(E) para *S. aureus*, 3,13 mg mL⁻¹(M) e 6,25 mg mL⁻¹(E) para *Salmonella enteritidis*, e ausência de inibição para *E. coli* nas concentrações testadas.

Como já avaliado no presente trabalho, o extrato de erva mate possui compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides, que são os principais responsáveis pela atividade microbiológica desempenhada por extratos vegetais, uma vez que as plantas sintetizam esse composto naturalmente em resposta a infecções microbianas

(KUMAR e PANDEY, 2013). Essa atividade antimicrobiana é promovida pelo mecanismo de interação do flavonoide bioativo com a região hidrofílica dos fosfolípidios na membrana celular e a eventual penetração dos mesmos ao núcleo hidrofóbico (HE et al., 2014)

Sabe-se que o BHA é um conservante muito utilizado na indústria farmacêutica com discreto poder antimicrobiano contra bactérias gram positivas e negativas (ROWE et al., 2012). Seu potencial foi avaliado em 1994 por Kabara, no qual observou concentração mínima inibitória de 2 mg mL⁻¹ para *E. coli* e 0,250 mg mL⁻¹ para *S. aureus*. Nota-se resultados coerentes ao encontrado no presente trabalho para *S. aureus*. No entanto, para *E. coli* a CIM apresentou diferença (2,0 mg mL⁻¹), que pode ser explicada pela existência de diferentes sorotipos deste microrganismo (EICHHORN et al., 2015).

No teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM) não foi observado eliminação completa dos microrganismos testados frente às concentrações avaliadas.

3.3 Desenvolvimento e validação do método analítico

O método por cromatografia líquida de ultra eficiência foi desenvolvido com base em levantamentos bibliográficos dos compostos de interesse contidos na erva mate, a fim de elucidar suas estruturas e determinar os parâmetros de quantificação. Com base nesse levantamento, considerou-se para a quantificação dos compostos da planta um representante do grupo dos alcaloides (cafeína), um do grupo do ácido hidroxicinâmico (ácido clorogênico) e dois do grupo dos flavonoides (quercetina e rutina), principais responsáveis pelas atividades antioxidante e/ou antimicrobiana (BURRIS et al., 2011; BOJIC et al., 2013).

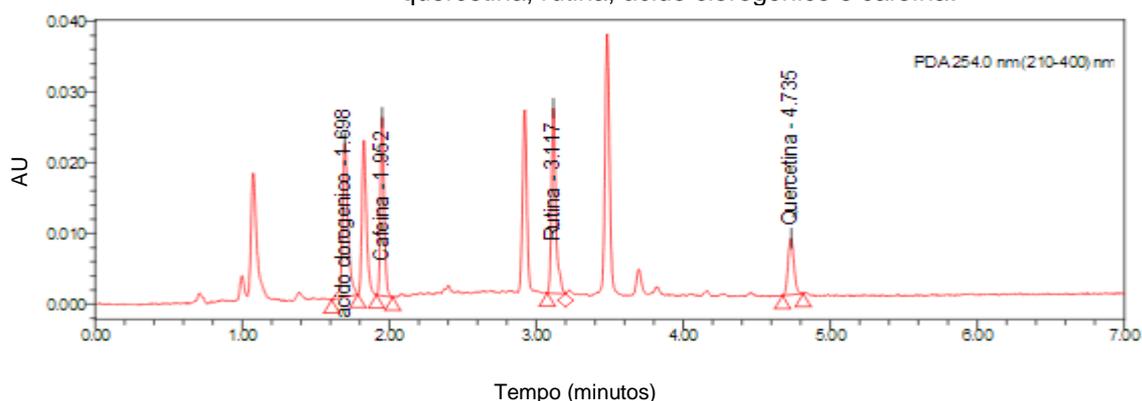
A metodologia analítica foi validada conforme guia Q2 (R1) da Conferência Internacional de Harmonização (International Conference on Harmonisation, ICH), e contemplou os parâmetros de especificidade, linearidade, limite de quantificação (é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão) e detecção (é a menor quantidade de analito

em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato), precisão, exatidão e robustez (ICH, 2005). Os critérios de aceitação para repetibilidade, intermediária e recuperação foram calculados considerando o limite de quantificação individual (Tabela 6), conforme guia de validação de métodos em análise farmacêuticas (ERMER e MILLER, 2005) e documento de orientação sobre validação de métodos analíticos do Immetro (DE ACREDITAÇÃO, 2011).

Vale ressaltar que não foi detectada quercetina na amostra de erva mate avaliada, possivelmente porque sua concentração encontrou-se abaixo do seu limite de detecção calculado, que foi de $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$. Portanto adicionou-se propositalmente quantidade conhecida desse analito à amostra e avaliou sua seletividade frente aos demais compostos. Os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e robustez foram avaliados apenas para os compostos efetivamente presentes no extrato (rutina, ácido clorogênico e cafeína).

A Figura 10 mostra o cromatograma da amostra preparada a partir do extrato, enriquecida com quercetina, ácido clorogênico, cafeína e rutina, pois contempla os ativos de interesse no método e demais picos referentes a outros componentes do extrato.

Figura 10 - Cromatograma do extrato de erva mate preparado em metanol e água, acrescido de quercetina, rutina, ácido clorogênico e cafeína.



O método desenvolvido mostrou-se adequado para a análise dos compostos citados, visto que os resultados estão de acordo com o preconizado pelo guia de validação de métodos em análise farmacêuticas (ERMER e MILLER, 2006). A especificidade é comprovada pela homogeneidade espectral dos picos de interesse,

que relaciona valores de ângulo de pureza (Purity Angle - PA) e ângulo limite de pureza (Purity Thresold - PT). Para demonstrar pureza de pico o valor do ângulo de pureza deve ser inferior ao ângulo limite de pureza. Para a cafeína os valores de PA e PT foram de 2,138 e 2,326, respectivamente. O ácido clorogênico obteve valores de 0,396 (PA) e 0,880 (PT), a rutina de 0,835 (PA) e 1,788 (PT) e a quercetina de 3,592 (PA) e 4,660 (PT).

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos em dois níveis (precisão repetibilidade (1) e intermediária (2)) pelos valores de desvio padrão relativo. Na Tabela 6 pode-se observar que os resultados de desvio padrão relativo atendem os critérios de aceitação. A exatidão avalia a recuperação dos ativos dentro de uma faixa determinada para cada nível avaliado. O resultado da Tabela 6 representa a média dos resultados obtidos em cada nível avaliado de cada composto e se mostra adequado ao que se propõe.

A linearidade pode ser comprovada pelo coeficiente de determinação (R^2), em que valores mais próximos de 1,0 mostram uma relação linear perfeita entre os dados. O resultados exibidos na Tabela 6 para " R^2 " se referem a média dos coeficientes de determinação das três curvas de cada ativo, em que todos os resultados se demonstraram satisfatórios ($>0,99$).

Tabela 6 – Resultados obtidos nos parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e detecção.

Ativo	Linearidade - Valor de R^2	Precisão 1 (DPR %)	Precisão 2 (DPR %)	Exatidão Recuperação (%)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ácido clorogênico	0,9991	3,81	1,74	99,19	0,15	0,04
Cafeína	0,9996	1,40	1,93	99,63	0,17	0,05
Rutina	0,9996	1,41	0,98	96,80	0,10	0,03

LQ: Limite de quantificação. LD: Limite de detecção. As especificações para os valores de precisão são de 10% para o nível mais baixo (1,0%), e 5% para os níveis mais altos (5,0 e 10,0%); O critério de aceitação para exatidão é de 80 a 120% (para 1,0%) e 90 a 110% (para 5,0 e 10,0%). Os valores representados consideram a média dos resultados de cada parâmetro.

A robustez indica a capacidade de um método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, que é comprovada por

valores de desvio padrão relativo (frente a condição original do método) e pureza de pico, conforme mostra a Tabela 7, em que todos os resultados atendem os critérios de aceitação, exceto temperatura. Além disso, os parâmetros de alteração de fase móvel apresentaram distorção nos picos ao longo do gradiente, o que inviabilizou a avaliação de pureza de pico e desvio padrão relativo.

Tabela 7 – Resultados de desvio padrão relativo e pureza de pico para os ativos (exceto quercetina) obtidos no parâmetro de robustez.

	Cafeína		Ácido clorogênico		Rutina	
	DPR (%)	PA PT	DPR (%)	PA PT	DPR (%)	PA PT
Fluxo 0,33	0,97	1,665	2,04	1,601	0,63	0,745
		3,029		2,645		3,607
Fluxo 0,37	0,12	2,509	1,91	2,489	0,12	0,626
		4,282		3,705		4,213
Temperatura 40°C	4,27	2,584	5,29	1,938	0,18	1,342
		4,075		3,143		5,171
Coluna (lote)	0,31	2,289	0,82	0,421	0,07	0,898
		2,431		0,903		1,649

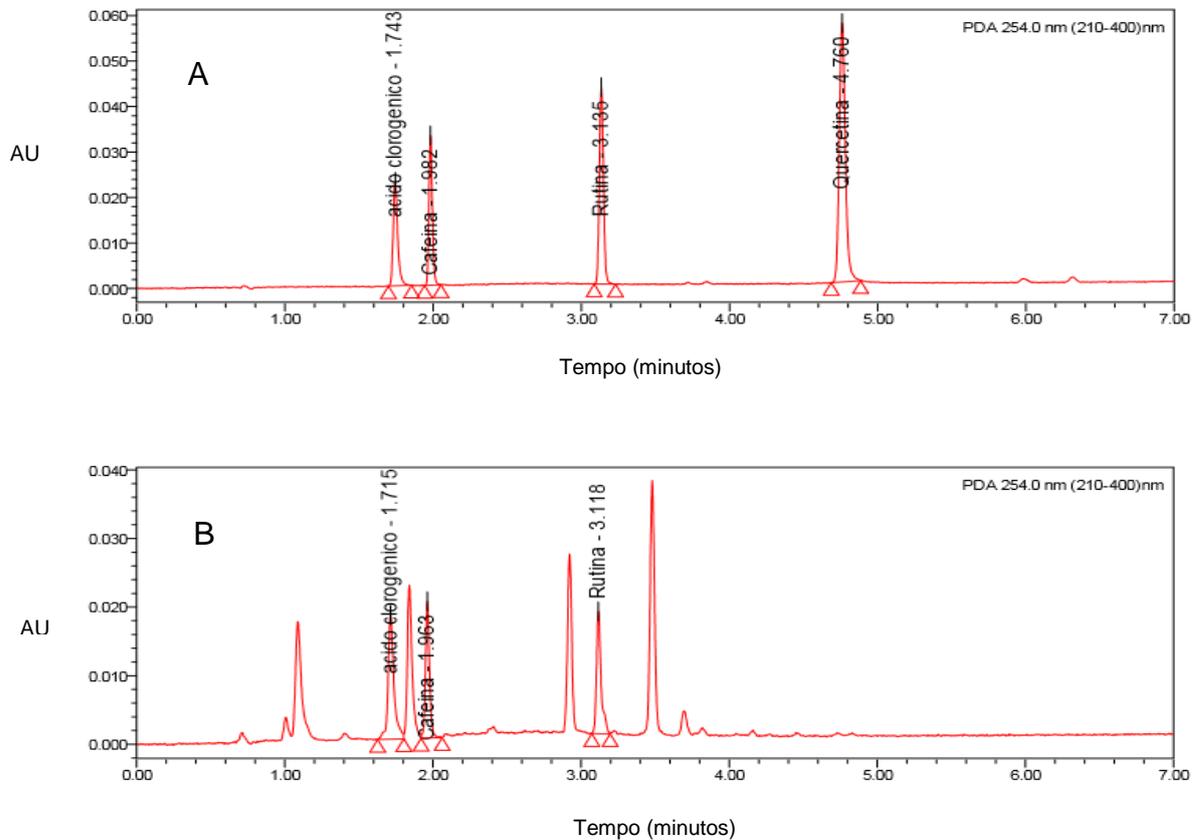
* DPR (Desvio Padrão Relativo); PA (Purity Angle); PT (Purity Threshold).

3.4 Quantificação de compostos por cromatografia líquida de ultra eficiência

Os resultados obtidos para a quantificação dos compostos na amostra foram de 49,6 mg g⁻¹ para ácido clorogênico com Desvio Padrão Relativo (DPR) de 1,83%, 34,5 mg g⁻¹ para cafeína com DPR de 0,36% e 23,1 mg g⁻¹ para rutina com DPR de 1,22 %, e a quercetina não foi detectada. Como discutido anteriormente, o ácido clorogênico possui atividade tanto antimicrobiana quanto antioxidante, o que favorece e fundamenta a aplicação do extrato em formulações alimentícias para atuar como conservante natural.

A Figura 11-A apresenta o cromatograma do padrão utilizado na quantificação da amostra, e a Figura 11-B a amostra do extrato de erva mate.

Figura 11 – Cromatogramas obtidos na quantificação dos compostos do extrato de erva mate avaliado por CLUE (A – padrão; B – amostra).



Bojic et al. (2013) avaliaram o extrato aquoso de erva mate por cromatografia líquida de alta eficiência e constataram a presença de 3 mg g^{-1} de ácido clorogênico, $2,3 \text{ mg g}^{-1}$ de rutina, $5,4 \text{ mg g}^{-1}$ de cafeína, e também não detectaram quercetina. Filip et al. (2001), analisaram extratos aquosos de *Ilex paraguayensis* e observaram a presença de 28 mg g^{-1} de ácido clorogênico, $0,6 \text{ mg g}^{-1}$ de rutina e $0,031 \text{ mg g}^{-1}$ de quercetina.

A diferença obtida tanto por Bojic et al. (2013), quanto por Filip et al. (2001) pode ser justificada pelo processo extrativo os quais a amostra foi submetida. Os dois autores citados prepararam seus extratos em água, já no presente trabalho o extrato foi preparado em solução hidroalcoólica. De acordo com Dent et al. (2012), diferentes solventes utilizados no processo de extração, sob tempo de agitação e temperatura diferentes podem promover a extração de diferentes compostos em diferentes quantidades.

3.5 Atividade antioxidante combinada (extrato de erva mate x BHA)

Os resultados de atividade antioxidante obtidos da avaliação da combinação entre extrato e BHA estão representadas no Gráfico 1, cujo o ajuste matemático que se mostrou mais adequado foi um polinômio de grau dois (cúbico), com coeficiente de correlação de 0,9895 (Equação 1), desvio padrão de $\pm 3,7 \%$ e média de 67,39%. Observa-se que o BHA possui atividade antioxidante superior ao extrato avaliado, uma vez que a inibição do radical DPPH, promovida por ele é maior, como já elucidado anteriormente.

$$R = + 0,00552778 + 0,048506 \times A + 0,15915 \times B + (- 0,00533 \times A \times B) + 0,00132667 \times A^2 - 0,00700677 \times B^2$$

(Equação 1)

Sabendo que o BHA é um antioxidante sintético com potencial citotóxico (VANDGHANOONI et al., 2013), é fundamental determinar qual a quantidade mínima a ser adicionada para que, junto com outro (s) composto (s), possam obter atividade antioxidante adequada. Na Figura 12, observa-se que, mesmo utilizando a máxima concentração de extrato, na ausência de BHA, a inibição do radical de DPPH é de aproximadamente 65%. Utilizando a Equação 1 (em que A se refere ao extrato de erva mate e B ao BHA) e adotando a máxima quantidade de extrato testado ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), é possível prever a quantidade de BHA mínima necessária para se obter a resposta máxima, que seria igual a $3,88 \mu\text{g mL}^{-1}$.

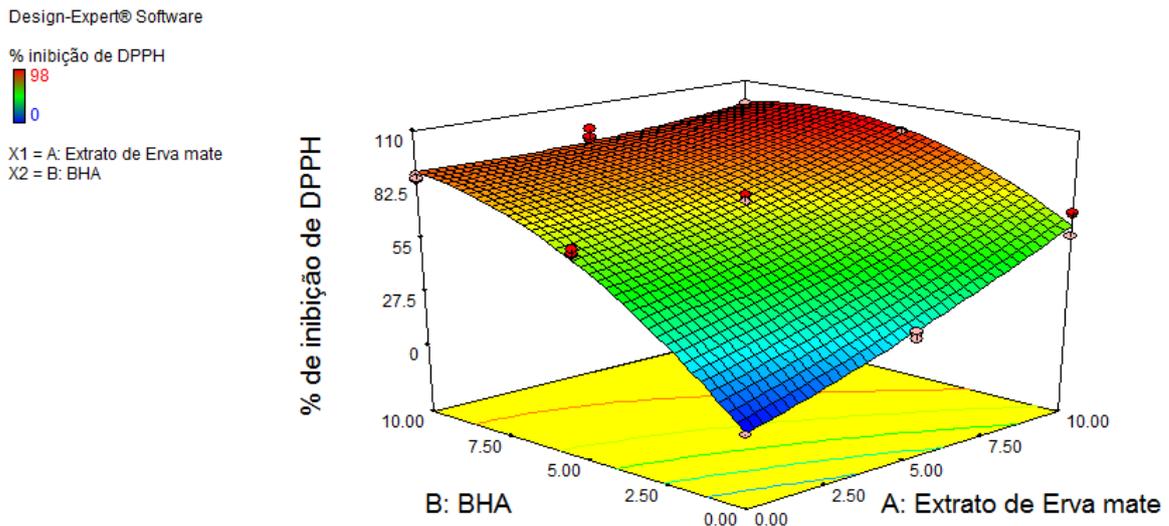


Figura 12 - Superfície de resposta para porcentagem de inibição do radical DPPH em diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de BHA (B) e extrato de erva mate (A) combinados.

A proposta de associar o conservante sintético com o extrato de erva mate tem como finalidade reduzir a quantidade de conservante sintético sem perder a eficiência de conservação, além de promover efeitos benéficos tanto a saúde do consumidor quanto a qualidade do produto.

3.6 Interação antimicrobiana por *checkerboard*

O teste de *checkerboard* foi executado associando o extrato de erva mate e butil hidroxianisol, e o resultado obtido de ICIF para *S. aureus* foi de 0,998, o que confere a essa associação um caráter aditivo, segundo classificação descrita por Nogueira (2012), ou seja, cada composto exerce sua atividade sem interferência um sobre o outro, seja ela sinérgica ou antagônica.

A proposta de avaliar a atividade sinérgica tanto entre extratos vegetais, quanto entre extratos vegetais e conservantes sintéticos, pretende elucidar fonte potencial de agentes antibacterianos naturais ou combinados, seguros e potentes para aplicação na indústria. As interações sinérgicas de extratos vegetais podem potencializar a eficácia antibacteriana, reduzir a concentração dos ativos e efeitos secundários adversos promovidos por conservantes sintéticos, e favorecer a qualidade nutricional do alimento (TAVEIRA et al. 2016).

Vale ressaltar que os extratos vegetais possuem inúmeros ativos em sua composição, que podem exercer efeito positivo ou negativo na sua resposta biológica, ou seja, uma planta que contém um ativo com atividade antimicrobiana pode ter seu efeito potencializado ou reduzido pela presença de outro composto da matriz. Assim, efeitos sinérgicos promovidos pela combinação de extratos vegetais podem ocorrer pela presença de diversos compostos associados em uma única mistura (BRUSOTTI et al., 2014).

3.7 Caracterização físico-química

Os resultados das análises físico-químicas do hambúrguer de peixe estão expostos na Tabela 8.

Pode-se observar que nenhuma das formulações apresentou diferença significativa para os testes de umidade e lipídios totais. Já para os demais testes da análise centesimal do hambúrguer de peixe os resultados obtidos apresentaram diferenças significativas entre as formulações.

Tabela 8 - Análise centesimal do hambúrguer de peixe envolvendo teste de umidade, proteínas totais, cinzas, lipídios totais e carboidratos.

Formulação	Umidade (g.100 ⁻¹ .g ⁻¹)	Proteínas (g.100 ⁻¹ .g ⁻¹)	Cinzas (g.100 ⁻¹ .g ⁻¹)	Lipídios (g.100 ⁻¹ .g ⁻¹)	Carboidrato (g.100 ⁻¹ .g ⁻¹)
F 1	71,08 ± 0,65 ^a	16,74 ± 1,30 ^{abc}	1,16±0,07 ^b	2,97± 0,22 ^a	8,05
F 2	71,62 ± 0,78 ^a	18,10 ± 0,87 ^a	1,25±0,02 ^{ab}	2,18± 0,04 ^a	6,85
F 3	71,59 ± 0,58 ^a	17,20 ± 0,86 ^{ab}	1,24±0,03 ^{ab}	2,54± 0,41 ^a	7,43
F 4	70,75 ± 0,84 ^a	14,59 ± 0,85 ^{bc}	1,28±0,05 ^{ab}	2,99± 0,38 ^a	10,39
F 5	71,11± 0,59 ^a	14,74 ± 0,73 ^c	1,32± 0,07 ^a	2,63± 0,40 ^a	10,20

As formulações de hambúrguer de peixe, representadas a seguir, se referem a: F1 (controle); F2 (0,01% de BHA); F3 (0,5% de extrato de erva mate); F4 (1,0% de extrato de erva mate); F5 (0,03% de BHA). Valores seguidos de letras distintas na coluna diferem-se significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05); os resultados são expressos como média ± desvio padrão (exceto carboidratos).

Os resultados de carboidratos apresentaram diferença significativa entre as formulações, avaliada pelo teste de Tukey com significância de 5%. No entanto, estes valores são calculados com base nos resultados de umidade, lipídios, proteínas e cinzas, que por sua vez já apresentam um desvio padrão individual, ou seja, há um desvio externo atribuído a esses resultados.

Pode-se verificar que as formulações 2, 3 e 4 não apresentaram diferença entre si em quantidade de cinzas, no entanto, observa-se diferença destas frente as formulações 1 e 5. Considerando que a formulação 1 não possui nenhum insumo além de peixe, farinha de mandioca branca e sal, seu resultado de 1,16 gramas de cinzas por 100 gramas de hambúrguer de peixe é justificado, uma vez que a porcentagem de peixe é maior neste tratamento, e este por sua vez possui alta umidade.

Já as diferenças observadas para o teste de proteínas podem ser justificadas pela precisão o método. Smart et al. (1983) avaliaram a precisão das técnicas de Kjeldahl e digestão por persulfato para quantificação de nitrogênio em água e observaram que o método de Kjeldahl é menos preciso. Portanto, as diferenças podem ser atribuídas a esse fator, já que a composição proteica base de todas as formulações foram às mesmas.

3.8 Avaliação da oxidação lipídica

Não foi detectada oxidação lipídica em nenhuma das formulações testadas, tanto pelo método de índice de peróxido, quanto pelo método de TBARS. Isso se deve, possivelmente, a baixa quantidade de lipídios presente nas formulações de hambúrguer de peixe quantificada por análises físico-químicas. O resultado negativo indica que a rancidez oxidativa não contribuiu negativamente na qualidade do produto (KIRSCHNIK e MACEDO, 2009).

3.9 Avaliação microbiológica

As Figuras 13 e 14 apresentam os resultados obtidos das análises microbiológicas realizadas no hambúrguer de peixe por um período de 28 dias.

Todas as formulações obtiveram resultados negativos para as análises de *Staphylococcus coagulase positiva* e *Salmonella* sp.

A especificação determinada pela RDC 12 de janeiro de 2001 para produtos à base de pescados ou congelados (hamburgueres e similares) é de ausência de *Salmonella* sp. 25 g^{-1} de amostra; $1,0 \times 10^3$ Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC g^{-1}) de amostra para *Staphylococcus coagulase positiva*, e de $1,0 \times 10^3$ NMP g^{-1} de amostra para coliformes a 45°C . Portanto, avaliando os resultados pode-se considerar que o hambúrguer de peixe elaborado no presente trabalho atende as especificações de condições sanitárias e comprova segurança para o consumo do produto, confirmando as boas condições higiênico-sanitárias nas etapas do processamento, cuidado nas operações de limpeza e sanitização dos utensílios e equipamentos, além de precauções na manipulação do produto.

Através de análise estatística por ANOVA, pôde-se avaliar os resultados de coliformes a 45°C , dos diferentes tratamentos, obtidos ao logo dos 28 dias de experimento. As avaliações de variância foram aplicadas comparando o tratamento controle (sem adição de conservante) com as demais formulações individualmente. Considerando a probabilidade de significância (valor de p), nenhuma das formulações apresentou diferença significativa quando comparadas com a formulação 1 (controle) para o referido teste, ou seja, a adição dos conservantes (natural ou sintético) não foi eficiente no controle de coliformes termotolerantes.

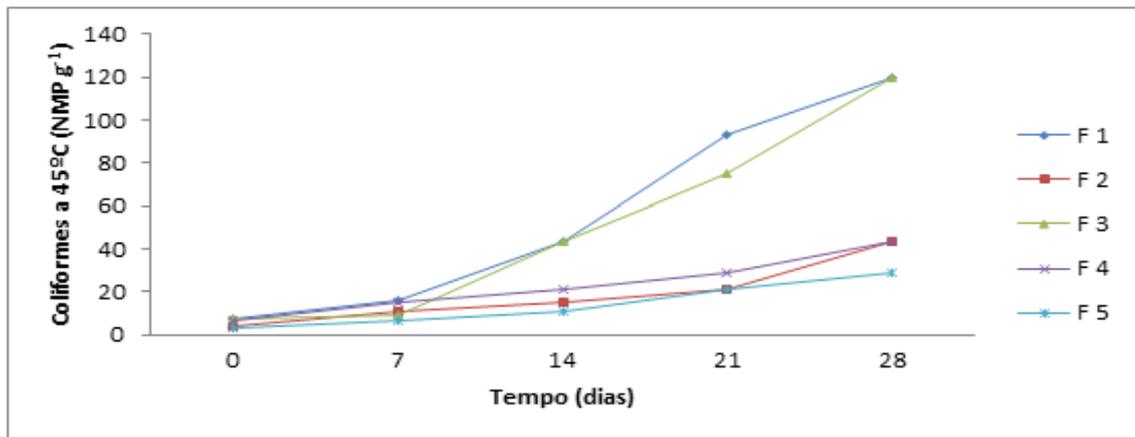


Figura 13 – Análise de coliformes termotolerantes das formulações de hambúrguer de peixe F1 (controle), F2 (0,01% de BHA), F3 (0,5% de extrato de erva mate), F4 (1,0% de extrato de erva mate) e F5 (0,03% de BHA) avaliadas por um período de 28 dias.

Os resultados obtidos da contagem de mesófilo também foram avaliados por ANOVA. Verificou-se que todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas quando comparadas com a formulação controle, exceto a formulação 3, na qual compreende 0,5% do extrato de erva mate. Nota-se que a formulação 1 apresenta valores crescentes mais expressivos das unidades formadoras de colônias, o que não ocorrer com as formulações 2, 4 e 5, já que o crescimento continua, mas em um ritmo reduzido. Neste caso, tanto o BHA quanto o extrato de erva mate a 1% mostraram-se capazes de exercer um leve efeito conservante.

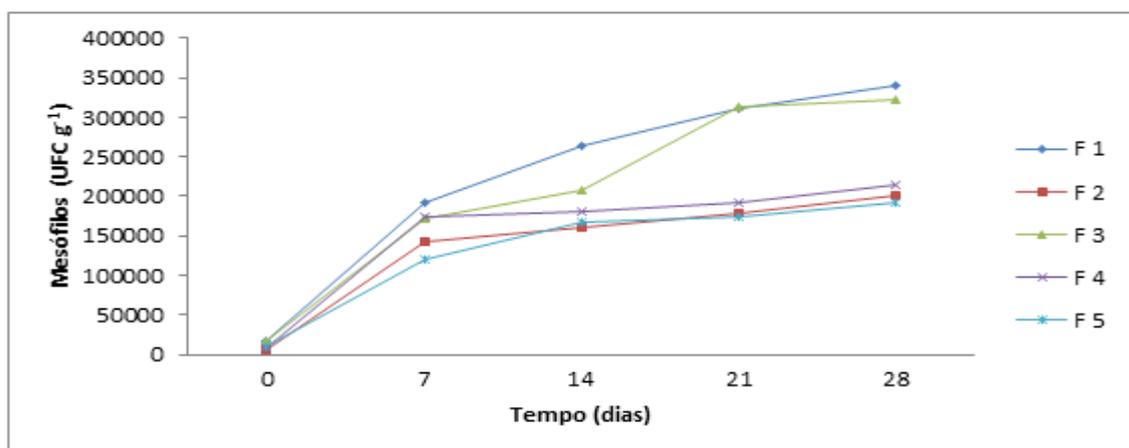


Figura 14- Análise de mesófilos das formulações de hambúrguer de peixe F1 (controle), F2 (0,01% de BHA), F3 (0,5% de extrato de erva mate), F4 (1,0% de extrato de erva mate) e F5 (0,03% de BHA) avaliadas por um período de 28 dias.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos na análise dos compostos fenólicos e flavonoides por espectrofotometria demonstraram um indicativo de potencial atividade biológica da erva mate, que posteriormente foram comprovadas experimentalmente. O potencial antioxidante e antimicrobiano avaliados são promovidos graças a moléculas específicas, que por sua vez foram quantificadas por cromatografia líquida de ultra eficiência. O método desenvolvido se mostrou específico, preciso, exato e linear e evidenciou a presença de ácido clorogênico, cafeína e rutina no extrato.

Levando em consideração a atividade antioxidante e antimicrobiana comprovada da erva mate, o desenvolvimento do hambúrguer de peixe acrescido do extrato se mostrou uma proposta promissora para substituir conservantes sintéticos por conservantes naturais, tornando o produto seguro para consumo e saudável aos consumidores. A formulação com a maior concentração do extrato (1,0%) apresentou resultado microbiológico favorável, uma vez que retardou o crescimento dos microrganismos no hambúrguer.

No entanto, sabe-se que a atividade antioxidante da erva mate é muito mais expressiva que a atividade antimicrobiana. Porém no hambúrguer de peixe isso não foi explorado, uma vez que o mesmo não sofreu oxidação. Sendo assim, estudos adicionais com a erva mate devem ser realizados em produtos potencialmente oxidáveis, com a finalidade de auxiliar na conservação desses alimentos e reduzir à aplicação de conservantes nocivos a saúde.

5 REFERÊNCIAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemist International. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17.ed. Gaithersburg (MD), 1170p. 2000.

AOCS 2003. Official method Cd 8 - 53, Surplus 2003. **Peroxide Value. Official methods and recommended practices of the AOCS**. American Oil Chemists Society(Champaign, IL, USA).

ATANASOV, A.; WALTERBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.; LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, 2015.

BERTÉ, K. A. S.; BEUX, M. R.; SPADA, P. K. 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 10, 2011.

BOJIĆ, M.; HASS, V. S.; SARIC, D.; MALES, Z. Determination of flavonoids, phenolic acids, and xanthenes in mate tea (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.). **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, vol. 2013, 6 pages, 2013. doi:10.1155/2013/658596

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; DE MORAIS, D. R. **Antioxidantes – Princípios e métodos analíticos**. Curitiba. Ed. Appris, p. 49 – 101, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

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

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, n. 2, 2012.

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

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 10th Ed: M07-A10. USA. 2015.

DE ACREDITAÇÃO, Coordenação Geral. DOQ-CGCRE-008/04 - **Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos**. 2011.

DE BEER, D.; JOUBERT, E.; GELDERBLUM, W. C. A.; MANLEY, M. Phenolic compounds: A review of their possible role as in vivo antioxidants of wine. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 23, n. 2, 2002.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, 5 ed, 2004.

DENT, M.; DRAGOVIC-UZELAC, V.; PENIC, M.; BRNCIC, M.; BOSILJKOV, T. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 84, 2013.

EICHHORN, I.; HEIDEMANN, K.; SEMMLER, T.; KINNEMANN, B.; MELLMANN, A.; HARMSSEN, D.; ANJUM, M. F.; SCHMIDT, H.; FRUTH, A.; VALENTIN-WEIGAND, P.; HEESEMANN, J.; SUERBAUM, S.; KARCH, H.; WIELWE, L. H. Highly virulent non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes reflect similar phylogenetic lineages, providing new insights into the evolution of EHEC. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 20, 2015.

EMBRAPA Florestas: **Sistemas de produção**, 1 – 2ª edição. INSS1678-8281 – Versão eletrônica. Ago/2010. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fontes_HTML/Erva-mate/CultivodaErvaMate_2ed/index.htm>. Acesso em: 24 outubro. 2016.

ENDO, E. H.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, 2010.

ERMER, J.; MILLER, J. H. McB (Ed.). **Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice**. John Wiley & Sons, 2006.

FILIP, R.; LOPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774-778, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. Revision A. 1998.

GUERREIRO, L. **Dossiê técnico – produção de hambúrguer**. REDETEC (rede de tecnologia do Rio de Janeiro). Rio de Janeiro. 2006.

ICH Harmonized Tripartite. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. Q2 (R1), v. 1, 2005.

MENGYING, H.; WU T.; PAN, S.; XU, X. Antimicrobial mechanism of flavonoids against *Escherichia coli* ATCC 25922 by model membrane study. **Applied Surface Science**, v. 305, p. 515-521, 2014.

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

HUANG, WY.; LEE, PC.; HSU, JC. LIN, YR.; CHEN, HJ. LIN, YS Effects of water quality on dissolution of yerba mate extract powders. **The Scientific World Journal**, vol. 2014, 6 pages, 2014.

KABARA, J. J. System approach to cosmetic preservation by using food-grade additives. **Journal of applied cosmetology**, v. 12, p. 31-31, 1994.

KIRSCHNIK, P. G.; MACEDO-VIEGAS, E. M. Efeito da lavagem e da adição de aditivos sobre a estabilidade de carne mecanicamente separada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante estocagem a-18 °C. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 200-206, 2009.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, vol. 2013, 16 pages, 2013.

KUMAR, S. Free radicals and antioxidants: human and food system. **Journal of Applied Sciences Research**. v. 2, n. 1, 2011.

MARTIN, J. G. P.; PORTO, E.; DE ALENCAR, S. M.; DA GLORIA, E. M.; CORRÊA, C. B.; CABRAL, I. S. R. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 45, n. 2, 2013.

MIDDLETON JR, Elliott. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. In: **Flavonoids in the Living System**. Springer US, 1998. p. 175-182.

MIRANDA, J.A.L; ROCHA, J.A; ARAUJO, K.M; QUELEMES, P.V; MAYO, S.J; ANDRADE, I.M. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). *Rev. bras. plantas med*, v. 17, n. 4, supl. 3, p. 1142-1149, 2015.

NEELAMBIKA, H. S.; LEELAVATHI, S. Comparative antioxidant activity of whole plant of *blepharis maderaspatensis* (L.) heyne ex roth. and *blepharis molluginifolia* pers. of Mysore district by DPPH method. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n. 03, 2015

NOGUEIRA, L. G. **Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. e de triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori***. Dissertação (Doutorado em ciências farmacêuticas). Universidade estadual paulista "Júlio de mesquita filho". Araraquara. 2012.

NOLLET, L. M. L. Handbook of food analysis. **Physical Characterization na Nutriente Analysis**. 2^o ed. New York: Marcel dekker, inc, Vol.1, 2004.

OH, J.; JO, H.; CHO, A. R.; KIN, S. J.; HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 403-409, 2013.

PAGLIOSA, C. M.; VIEIRA, M. A.; PODESTA, R.; MARASCHIN, M.; ZENI, A.L.B.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. Methylxanthines, Phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 173-178, 2010.

POMILIO, A. B.; TRAJTEMBERG, S.; VITALE, A. A. High-performance capillary electrophoresis analysis of Mate infusions prepared from stems and leaves

of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 4, p. 235-241, 2002.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; COOK, W. G.; FENTON, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. ed. PHARMACEUTICAL PRESS, v. 7, 2012.

SARKAR, A.; GOLAY, P.A.; ACQUISTAPACE, S.; CRAFT, B. Increasing the oxidative stability of soybean oil through fortification with antioxidants. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 3, p. 666-673, 2015.

SMART, M. M.; RADA, R. G.; DONNERMEYER, G. N. Determination of total nitrogen in sediments and plants using persulfate digestion. An evaluation and comparison with the Kjeldahl procedure. **Water research**, v. 17, n. 9, p. 1207-1211, 1983.

SOXHLET, F. The weight analytic determination of milk fat. **Polytechnisches Journal**, v. 232, p. 461-465, 1879.

TAVEIRA, G. B; CARVALHO, A. O.; RODRIGUES, R.; TRINDADE, F. G.; DA CUNHA, M.; GOMES, V. M. Thionin-like peptide from *Capsicum annum* fruits: mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, 2016.

TIWARI, B. K.; VALDRAMIDIS, V. P.; O'DONNELL, C. P.; MATHUKUMARAPPAN, K.; BOURKE, P.; CULLEN, P.J. Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, 2009.

VALERGA, J.; RETA, M.; LANARI, M. C. Polyphenol input to the antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. **LWT-Food Science and Technology**, v. 45, n. 1, 2012.

VANDGHANOONI, S.; FOROOUHARMEHR, A.; ESKANDANI, M.; BERZEGARI, A.; KAFIL, V.; KASHANIAN, S.; DOLATABADI, J. E. N. Cytotoxicity and DNA fragmentation properties of butylated hydroxyanisole. **DNA and Cell Biology**, v. 32, n. 3, 2013.

ZAPOROZHETS O. A., KRUSHYNSKA O. A., LIPKOVSKA N. A., BARVINCHENK V. N. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 21-25, 2004.

ZHANG, L.; LI, X.; LU, W.; SHEN, H.; LUO, Y. Quality predictive models of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) at different temperatures during storage. **Food Control**, v. 22, n. 8, 2011.