

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

**ANTIOXIDANTE NATURAL DE MARCELA**  
**(*Achyrocline satureioides*) E DE ERVA MATE**  
**(*Ilex paraguariensis*) NA ELABORAÇÃO DE**  
**LINGÜIÇA TOSCANA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Eduardo Borges de Brum**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2009**

**ANTIOXIDANTE NATURAL DE MARCELA (*Achyrocline  
satureioides*) E DE ERVA MATE (*Ilex paraguariensis*)  
NA ELABORAÇÃO DE LINGÜIÇA TOSCANA**

por

**Eduardo Borges de Brum**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

Orientador: Prof. Nelcindo Nascimento Terra, Dr.

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos  
Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ANTIOXIDANTE NATURAL DE MARCELA (*Achyrocline  
satureioides*) E DE ERVA MATE (*Ilex paraguariensis*) NA  
ELABORAÇÃO DE LINGÜIÇA TOSCANA**

elaborada por

**EDUARDO BORGES DE BRUM**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Nelcindo Nascimento Terra, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Djalma Dias da Silveira, Dr. (UFSM)**

---

**Luis Fernando Vilani de Pelegrini, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2009.

Dedico este trabalho aos meus  
maiores tesouros, meus filhos,  
Vinícius e Victória e a minha esposa,  
Danielli.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Santa Maria, ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos e ao Exército Brasileiro agradeço pela oportunidade proporcionada por estas instituições para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nelcindo Nascimento Terra, agradeço pela orientação, por acreditar em mim, pela amizade e especialmente, agradeço ao ensejo de poder trabalhar e instruir-me com ele.

Ao Tenente Coronel Marcelo Brandão Vieiralves de Almeida, ao Tenente Coronel Marcos Abílio Castro Pimenta, ao Tenente Coronel João Henrique de Oliveira Vianna e a Tenente Cristiane Andrade da Silva pelo estímulo e compreensão durante essa caminhada.

Aos colegas e amigos Liana Inês Guidolin Milani, Leadir Lucy Martins Fries, Carlos Cavalheiro, Milton J. Brustolin e Rogério M. L. de Campos, agradeço pela disponibilidade e apoio na realização deste trabalho.

À minha esposa Danielli, agradeço pelo amor, compreensão, estímulo, por sempre estar ao meu lado e por todo apoio na minha formação.

Aos meus filhos Vinícius e Victória pelo tempo subtraído do seio familiar para realização deste trabalho.

Aos meus pais e a toda a minha família, agradeço pelo apoio.

Agradeço a todos os professores e funcionários do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, aos bolsistas e aos colegas de trabalho que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	09
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Lingüiça toscana.....	13
2.2 Oxidação lipídica.....	15
2.2.1 TBARS.....	18
2.3 Antioxidantes.....	19
2.3.1 Antioxidantes sintéticos.....	20
2.3.2 Antioxidantes naturais.....	20
2.4 Extratos.....	21
2.5 Marcela.....	23
2.6 Erva mate.....	24
3 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	26
3.1 ARTIGO 1 EFEITO DOS EXTRATOS HIDRO-ETANÓLICOS DE ERVA MATE ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) E DE MARCELA ( <i>Achyrocline satureioides</i> ) NA INIBIÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA E NA COLORAÇÃO DE BANHA SUÍNA.....	26
3.2 ARTIGO 2 NATURAL ANTIOXIDANT OF YERBA MATE ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) AND MARCELA ( <i>Achyrocline satureioides</i> ) IN AND THE DEVELOPMENT OF TUSCANY SAUSAGE.....	42
4 DISCUSSÃO.....	61
5 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria

### **ANTIOXIDANTE NATURAL DE MARCELA (*Achyrocline satureioides*) E DE ERVA MATE (*Ilex paraguariensis*) NA ELABORAÇÃO DE LINGÜIÇA TOSCANA**

AUTOR: Eduardo Borges de Brum

ORIENTADOR: Nelcindo Nascimento Terra

CO-ORIENTADORA: Leadir Lucy Martins Fries

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2009.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver antioxidantes naturais de *Achyrocline satureioides* (marcela) e de *Ilex paraguariensis* (erva mate), para adição em lingüiça toscana e banha suína, com avaliação e determinação das melhores constituições quanto à atividade antioxidante e características sensoriais dos produtos. No primeiro experimento, foi avaliado o efeito de dois níveis (0,5% e 1%) de extratos hidro-etanólicos de erva mate e de marcela, bem como da composição mista de extratos de erva mate e marcela (1/1:v/v), na inibição da oxidação lipídica e a interferência na colorimetria (CLab) da banha suína. A atividade antioxidante foi elevada para todos os extratos e composições mistas de extratos. Observaram-se valores entre 91,86 e 99,15% na inibição da oxidação lipídica, no teste de oxidação acelerada e não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos. Não foi observado efeito sinérgico, nem antagônico, na composição mista de extratos de erva mate e de marcela (1/1:v/v) sobre a inibição da oxidação. Na análise da colorimetria das coordenadas  $a^*$  e  $b^*$ , o extrato de erva mate a 1% obteve o valor mais alto, diferenciando-se significativamente ( $p < 0,05$ ) dos demais, indicando uma maior interferência na cor da banha suína. Quanto à coordenada  $L^*$ , o controle, as composições mistas de extratos (0,5% e 1%) e o extrato de marcela (0,5%) não demonstraram diferença significativa ( $p > 0,05$ ), indicando não haver interferência, na luminosidade, da banha suína. No segundo experimento foi avaliado o efeito do extrato hidro-etanólico e do extrato purificado de marcela e de erva mate adicionado (0,5%) em lingüiça toscana, com análise da estabilidade lipídica (TBARS), qualidade (pH e atributos sensoriais) e microbiologia (aeróbias mesófilos, coliformes a 45 °C/g, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Clostridium* sulfito redutores a 46 °C e *Salmonella* sp). Todos os tratamentos apresentaram estabilidade lipídica durante o período de armazenamento a 4 °C, exceto o controle que sofreu aceleração do processo de oxidação a partir dos 30 dias. Não houve interferência da adição dos extratos sobre o pH das lingüiças em comparação com o controle. Na análise sensorial o extrato hidro-etanólico de erva mate interferiu ( $p < 0,05$ ) em comparação ao controle. Nas análises microbiológicas, durante o período de armazenamento a contagem de *Clostridium* sulfito redutores a 46 °C foi menor que  $1 \times 10^1$  UFC.  $g^{-1}$ , *Staphylococcus* coagulase

positiva foi menor que  $1 \times 10^2$  UFC.  $g^{-1}$ , coliformes a  $45^\circ C$  foi menor que  $1 \times 10^1$  UFC.  $g^{-1}$  e *Salmonella* sp foi ausente em 25g. A contagem de aeróbios mesófilos para todos os tratamentos foi inferior a  $10^6$  UFC.  $g^{-1}$ , durante o armazenamento e as lingüiças sofreram ligeiras oscilações, com redução da contagem de aeróbios no dia 12 e progressivos aumentos. No final do período de armazenagem, a partir de 30 dias, houve um processo de crescimento bacteriano em todas as amostras, exceto em lingüiças adicionadas de extrato hidro-etanólico de marcela. A adição de 0,5% do extrato purificado de erva mate, ou hidro-etanólico, ou purificado de marcela pode ser utilizada na preparação de lingüiça toscana, fornecendo produtos mais seguros para os consumidores.

**Palavras-chave:** antioxidante natural; erva mate; marcela; lingüiça, oxidação



## ABSTRACT

Master Dissertation  
Pos-Graduate Course of Food Science and Technology  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

### **ANTIOXIDANTE NATURAL DE MARCELA (*Achyrocline satureioides*) E DE ERVA MATE (*Ilex paraguariensis*) NA ELABORAÇÃO DE LINGÜIÇA TOSCANA**

(NATURAL ANTIOXIDANT OF YERBA MATE (*Ilex paraguariensis*) AND MARCELA (*Achyrocline satureioides*) IN AND THE DEVELOPMENT OF TUSCANY SAUSAGE)

AUTHOR : Eduardo Borges de Brum

ADVISER: Nelcindo Nascimento Terra

CO-ADVISER: Leadir Lucy Martins Fries

Place and Date of Defense: Santa Maria, February 27<sup>th</sup>, 2009.

This study aimed to develop natural antioxidants of *Achyrocline satureioides* (marcela) and *Ilex paraguariensis* (yerba mate), in addition to tuscan sausage and porcine barth, with evaluation and determination of the best constitutions in the antioxidant activity and sensory characteristics of products. In the first experiment, was evaluated the effect of two levels (0,5% and 1%) of hydro-ethanolic extracts of marcela and yerba mate, and the mixed composition of extracts of marcela and yerba mate (1/1:v/v) in the inhibition of lipid oxidation and interference in the colorimetric (*C Lab*) of porcine barth. The antioxidant activity was high for all the extracts and compositions of mixed extracts. Values were observed between 91,86 and 99,15% of the inhibition of lipid oxidation in accelerated oxidation test and no significant difference ( $p>0,05$ ) between treatments. There was no synergistic effect or antagonistic, the composition of mixed extracts of marcela and yerba mate (1/1:v/v) on the inhibition of oxidation. In the analysis of colorimetric coordinates  $a^*$  and  $b^*$ , yerba mate extract (1%) obtained the highest value, differentiating it significantly ( $p<0,05$ ) of the others, indicating greater interference in the color of porcine barth. As for the  $L^*$  coordinate, control, the mixed compositions of extracts (0,5% and 1%) and extract of marcela (0,5%) showed no significant difference ( $p>0,05$ ), indicating no interference in the light of porcine barth. In the second experiment was to evaluate the effect of hydro-ethanolic extract and purified extract of marcela and yerba mate, added (0,5%) in tuscan sausage, with analysis of lipid stability (TBARS), quality (pH and sensory attributes) and microbiology (aerobic mesophiles, coliforms at 45 °C/g, *Staphylococcus* coagulase positive, *Clostridium* Sulphite reducing to 46 °C and *Salmonella* sp). All treatments showed lipid stability during storage at 4 °C, except the control that has accelerated the process of oxidation from 30 days. There was no interference of the addition of the extracts on the pH of the

sausages in comparison with the control. In sensory analysis the hydro-ethanolic extract of yerba mate interfere ( $p < 0,05$ ) compared to control. In the microbiological analysis during the period of storage, the count of *Clostridium* sulphite reducing to 46 C was less than  $1 \times 10^1$  CFU.  $g^{-1}$ , *Staphylococcus* coagulase positive was less than  $1 \times 10^2$  CFU.  $g^{-1}$ , coliforms at 45 ° C was less than  $1 \times 10^1$  CFU.  $g^{-1}$  and Salmonella was absent in 25g. The count of aerobic mesophiles for all treatments was lower than  $10^6$  CFU.  $g^{-1}$ , during storage and sausages have slight variations, reducing the count of 12 days and progressive increases. At the end of the storage period from 30 days, there was a process of bacterial growth in all samples, except in sausages added hydro-ethanolic extract of marcela. The addition of 0,5% of purified extracts of yerba mate, or hydro-ethanolic, or purified from marcela can be used in the preparation of tuscan sausage and provide safer products for consumers.

**Keywords:** natural antioxidants; yerba mate; marcela; sausage; oxidation

# 1 INTRODUÇÃO

A oxidação lipídica é um importante fator limitador da qualidade da carne e de produtos cárneos e tem interferido na aceitabilidade dos consumidores (GRAY, GOMMA e BUCKLEY, 1996). Este fenômeno causa desvalorização comercial e leva a indústria de produtos cárneos a adotar medidas que o limitem, pois este processo de oxidação também chamado de rancificação acarreta alterações organolépticas nos produtos, tais como, alterações da coloração da carne e da gordura, desenvolvimento de sabor e aroma desagradáveis à saúde humana, tornando os alimentos impróprios para consumo, além de também provocar outras alterações que irão afetar a qualidade nutricional através da formação de compostos potencialmente tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (NEWBURG e CONCON, 1980; KUBOW, 1990; PANIANGVAIT *et al.*, 1995).

Antioxidantes são utilizados para prevenir ou retardar a oxidação lipídica nos produtos. Todavia, a adição de antioxidantes sintéticos começou a ser restringida nos últimos anos, devido à diminuição da aceitação pelo consumidor (SÁNCHEZ-ESCALANTE *et al.*, 2001) e pelos efeitos danosos à saúde humana (MARTHA-ESTRELLA, NIOKHOR e STEVANOVIC, 2007).

Devido a crescente demanda de utilização dos antioxidantes naturais em nível industrial, a presença de compostos fenólicos em plantas tem sido muito estudada pelo fato destes inibirem a oxidação lipídica, além de participarem de processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos (PELEG, BODINE e NOBLE, 1998), contudo, há necessidade de se buscar a melhor forma de utilização dos vegetais para esta finalidade, haja vista que os extratos elaborados até então tem apresentado bons resultados quanto à atividade antioxidante, porém ainda detém algumas interferências nas características sensoriais dos produtos adicionados.

Propriedades funcionais como o alto conteúdo de flavonóides nos extratos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C (marcela), o alto teor de ácidos fenólicos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva mate), as propriedades antioxidantes de ambas, a boa disponibilidade na flora silvestre brasileira e o

baixo custo de obtenção, justificam a utilização dessas plantas no presente trabalho, onde foram avaliados os extratos hidro-etanólicos (brutos) e purificados de erva mate e de marcela, além da composição mista desses extratos e a sua aplicação em lingüiça toscana e banha suína, durante o período de armazenamento.

Baseado nisto, o objetivo geral do presente trabalho foi desenvolver antioxidantes naturais de *Achyrocline satureioides* (marcela) e de *Ilex paraguariensis* (erva mate), para adição em lingüiça toscana, com avaliação e determinação das melhores constituições quanto à atividade antioxidante e características sensoriais dos produtos. Os objetivos específicos foram:

- ✓ elaborar extratos naturais de marcela e de erva mate, utilizando técnica de mistura de solventes com diferentes polaridades;
- ✓ avaliar os extratos quanto à proteção antioxidante em testes de oxidação acelerada e colorimetria;
- ✓ submeter os extratos à purificação;
- ✓ formular produto cárneo (lingüiça toscana) e adicionar os extratos em diferentes teores;
- ✓ analisar o produto cárneo durante os prazos de armazenamento, sob parâmetros físico-químicos e microbiológicos;
- ✓ quantificar a aceitação das formulações, em prova sensorial.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Lingüiça toscana

Desde a longínqua antiguidade, o homem vem fabricando diversos tipos de lingüiças, buscando conservar a carne e oferecer um produto ao alcance das aspirações do consumidor. Há registros na história do consumo de lingüiças entre os babilônios e chineses já por volta de 1500 a.C.

A partir da Idade Média, uma grande variedade de lingüiças era comercializada e essas variedades tinham uma forte influência do tipo de clima da região de origem. Muitas lingüiças são designadas segundo as regiões onde foram desenvolvidas; é o caso das lingüiças calabresa (Calábria, Itália), toscana (Toscana, Itália), portuguesa (Portugal), entre outras (TERRA, 1998). Segundo Oda *et al.* (2003) o embutido apareceu no Brasil graças às receitas tradicionais, trazidas por famílias imigrantes alemãs e italianas, embora tenha sofrido adaptações às condições climáticas e ao paladar local. Com a modernização e diversificação da produção nos frigoríficos, houve um aumento no volume da carne embutida, transformando-se em fonte de proteína animal.

Em conformidade com Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000) a lingüiça designada Toscana é o produto cru obtido exclusivamente de carne suína, adicionada de gordura suína e ingredientes. No Brasil, lingüiça frescal é um dos produtos cárneos mais consumidos.

Entre os parâmetros que definem a qualidade de um produto cárneo, a formulação é um dos mais importantes. A elaboração de um produto cárneo inicia-se pela definição dos componentes, requer informações sobre as propriedades e a composição das matérias-primas cárneas incluídas no produto. Esta formulação deverá cumprir com os requisitos de legislação, qualidade organoléptica e de estabilidade microbiológica, além de apresentar custo compatível à comercialização do produto (ALMEIDA, 2005). Uma

formulação adequada deve basear-se em informações precisas sobre a composição das matérias-primas (relação umidade:proteína, teor de gordura, pH, teor de tecido conjuntivo, cor e temperatura). O processamento das lingüiças frescas é relativamente simples e, com a observação de certas regras, a produção desse tipo de produto pode ser muito lucrativa ao fabricante. As principais etapas envolvidas no processamento de lingüiça são: recebimento da matéria-prima; preparo e formulação; moagem; misturas das carnes com condimentos e aditivos até completa homogeneização para desenvolvimento do sabor e início do processo de cura; embutimento. Segundo Terra (1998) produtos cárneos curados são os produtos em cuja elaboração são utilizados os sais de cura. Esses sais são constituídos de uma mistura de cloreto de sódio e nitrito. A primeira mistura é utilizada em produtos cárneos cuja elaboração consome vários dias, tendo em vista a necessidade de tempo para que as bactérias reduzam o nitrato em nitrito. Adicionados os sais de cura à massa cárnea, ocorrerá uma série de reações, resultando na formação de Óxido Nítrico (NO) que dá coloração vermelha à mistura. Para que haja aceleração do processo podem ser utilizadas as curas rápidas para lingüiças que contém glicose, como meio redutor e ácido cítrico que regula o pH para 5,7, facilitando a passagem de nitrito à ácido nítrico e posteriormente até NO.

Devido ao alto teor de gordura, a natureza das matérias-primas e a falta de tratamento térmico, tal produto é propenso à deterioração por ambas, a oxidação lipídica e a contaminação microbiana (GEORGANTELIS *et al.*, 2007). Uma higiene perfeita dos equipamentos, utensílios e de toda a área de processamento deve ser observada. A lingüiça, mesmo mantida sob refrigeração, começa a apresentar certas modificações no quinto ou sexto dia, após o processamento. No entanto, sob condições adequadas de processamento incluindo uso de aditivos permitidos como nitrito de sódio, condimentos esterilizados e com boas práticas de fabricação, a vida útil pode ser prolongada por 15 a 20 dias sob refrigeração adequada (IBRAC, 1980; PRÄNDL *et al.*, 1994).

## 2.2 Oxidação lipídica

A oxidação dos lipídios, que ocorre durante o armazenamento, processamento e aquecimento, é um processo básico causador de rancidez nos produtos alimentícios, promovendo a deterioração oxidativa (HUDSON, 1990). Conforme Almeida (2005 apud MORRISEY *et. al.*, 1998), as alterações bioquímicas que acompanham a conversão do músculo em carne oferecem condições favoráveis para que ocorra a oxidação na fração mais insaturada de fosfolipídios nas membranas subcelulares, onde o balanço entre os fatores pró-oxidativos e a capacidade antioxidativa não está controlado, favorecendo a oxidação lipídica. Os produtos da oxidação lipídica são indesejáveis, não somente pela produção de odores e flavours ofensivos, como resultado da decomposição de lipídios e produção de compostos voláteis, mas também, pela destruição de constituintes essenciais, ocasionando o decréscimo do valor nutricional dos alimentos e a formação de compostos tóxicos durante o processamento (KAHL e HILDEBRANDT, 1986; FRANKEL, 1996). Além disso, os produtos da oxidação lipídica podem causar modificações patológicas na mucosa intestinal, atividade inibitória de enzimas e aumento no teor de colesterol e peróxidos no soro sanguíneo, desse modo, ativa o processo de aterosclerose (KARPINSKA, BOROWSKY e DANOWSKA-OZIEWICZ, 2001). Neste contexto, a oxidação lipídica pode ser considerada um processo autocatalítico, onde os produtos das reações iniciais propagam-se em cadeia, envolvendo três estágios: a iniciação, a propagação e a terminação (COULTATE, 2002; GORDON, 1990; HAMILTON *et al.*, 1997).

A autoxidação é iniciada com a formação de radicais livres, entidades reativas e estruturalmente instáveis. O mecanismo de formação do primeiro radical livre ainda não se encontra devidamente esclarecido e provavelmente a principal via geradora de radicais livres seja a decomposição de hidroperóxidos (ROOH) que existem em alimentos em mínimas quantidades (traços) antes mesmo do início da autoxidação (GORDON, 1990). Estas moléculas são geradas a partir da reação da molécula lipídica com o oxigênio na presença de catalisadores, como luz visível, irradiação, radiação ultravioleta, temperatura e metais, que são denominados de iniciadores. Outra

via de formação dos hidroperóxidos é a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados catalisada por lipoxigenases e outras oxidases que representam outra forma distinta de iniciação (ADEGOKE, *et al.*, 1998; ARAÚJO, 1999). Ainda, segundo Torres (2003) as principais causas do desenvolvimento da rancidez são hidrólise e oxidação lipídica. A rancidez hidrolítica provoca a liberação de ácidos graxos, sendo geralmente as lipases (microbianas ou da própria carne) que iniciam o processo de rancificação das gorduras. No caso das lingüiças, o início da reação de rancidez oxidativa é catalisado pela ação do oxigênio do ar sobre os ácidos graxos insaturados presentes na gordura suína. De acordo com Kahl e Hildebrandt (1986), a autooxidação lipídica é iniciada pela formação de radicais livres, os quais atacam e abstraem um átomo de hidrogênio de um radical metil, adjacente a dupla ligação do ácido graxo insaturado, deixando um elétron desemparelhado no carbono, gerando um radical alila.

Nas fases de iniciação e propagação, a presença de radicais livres, que são moléculas extremamente reativas, é decisiva (ADAMS e MOSS, 1999). Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou átomos que possuem um elétron desemparelhado na última camada, ocupando um único orbital atômico ou molecular (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2000). Essas formas reativas são normalmente produzidas durante o metabolismo do oxigênio nos tecidos e são chamadas de espécies reativas de oxigênio (ROS - Reactive Oxygen Species). Estes compostos dividem-se em radicais superóxido ( $O^2$ ) e hidroxila (HO) ou não radicais peróxido ( $H^2O^2$ ). Alguns deles são produzidos durante o metabolismo aeróbio das células vivas, como o radical superóxido, que é formado pela adição de um elétron extra ao oxigênio molecular, durante o processo de redução do oxigênio na cadeia respiratória mitocondrial. Da mesma forma, os macrófagos, quando estimulados, produzem radicais superóxido ( $O^2$ ) e  $H^2O^2$  durante o processo normal de fagocitose (COMBS, 1998). Mesmo apresentando pouca reatividade química, os compostos  $O^2$  e  $H^2O^2$ , quando expostos a determinados íons metálicos ( $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ ), geram um radical livre altamente reativo, o radical hidroxila, este é provavelmente, o radical livre mais importante para a iniciação do processo de oxidação nos tecidos animais, uma vez que ele pode rapidamente remover um átomo de hidrogênio do ácido graxo insaturado (ADAMS e MOSS, 1999). Os



principais alvos do radical hidroxila são os lipídeos, especialmente os ácidos graxos insaturados da membrana celular, as proteínas e o DNA (COMBS, 1998). Na fase de iniciação: estão envolvidas ações dos radicais livres e o mecanismo natural de defesa antioxidante, no organismo ainda vivo, alteração na estrutura das membranas celulares. Suas características podem ser resumidamente descritas como o baixo consumo de oxigênio, aumentando lentamente e baixa concentração de peróxidos, não há alterações sensoriais e aumenta a concentração de radicais livres (BOBBIO e BOBBIO, 2001).

Na fase de propagação ocorre a destruição oxidativa, sendo que no período imediatamente antes e pós-abate, ocorre uma série de eventos bioquímicos, tais como, falha do sistema antioxidante natural, diminuição do pH, ação enzimática, desnaturação protéica, liberação de ferro. Características suas como o alto consumo de oxigênio, promove o aumento da concentração de peróxidos e inicia a decomposição, há o início das alterações sensoriais com aparecimento de odor característico, provocado pelos produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Na terceira fase, ou terminação, as características são: consumo de oxigênio tendendo a cair, diminuição dos peróxidos e forte alteração sensorial, podendo haver alterações da cor e viscosidade (BOBBIO e BOBBIO, 2001). É a fase mais crítica, por ocasião do processamento, manuseio, moagem, trituração, cozimento e estocagem, determinando o rompimento da membrana celular, potencializado pela adição de água, adição de sal, temperatura, liberação de ferro, presença de oxigênio, ação microbiológica (OLIVO, 2005).

A estabilidade oxidativa dos alimentos é dependente do equilíbrio entre a composição e concentração do substrato e a presença de pró-oxidantes. A remoção do oxigênio, inativação de enzimas, proteção contra luz e íons metálicos são importantes para evitar ou minimizar a oxidação lipídica. No entanto, estas medidas nem sempre são aplicáveis. A adição de antioxidantes constitui prática mais comum para aumentar a estabilidade dos lipídios. Portanto, a prevenção destas reações poderá minimizar os seus efeitos adversos, e aumentar a vida-de-prateleira (shelf-life) dos alimentos (KRING e BERGER, 2001).

### 2.2.1 TBARS

Testes como índice de peróxidos, ácidos graxos livres, anisidina, Kreis, TBA (ácido 2-tiobarbitúrico), valor Totox (valor total de oxidação) e compostos voláteis são utilizados no controle de qualidade de óleos, gorduras e produtos que a contenham, por fornecerem informações valiosas e essenciais a respeito do estado oxidativo, na predição da rancidez do alimento analisado (OSAWA, FELÍCIO e GONÇALVES, 2005). O método mais usual para acompanhar a evolução da oxidação de lipídios em carnes e produtos cárneos é o teste de TBA, devido à sua simplicidade e rapidez. O teste de TBA quantifica o malonaldeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo. De acordo com Miyagusku *et al.* (2007) as substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico são preferencialmente formadas a partir da clivagem de ácidos graxos com duplas ligações. Os hidroperóxidos formados podem originar compostos contendo grupamentos carbonílicos, sendo o malonaldeído o principal alcadienal relacionado com o processo de oxidação lipídica. A reação envolve o ácido 2-tiobarbitúrico com o malonaldeído, produzindo um composto de cor vermelha, medido espectrofotometricamente a 532 nm de comprimento de onda (de acordo com a metodologia, esse comprimento de onda pode variar, situando-se ao redor de 500 a 550 nm). Os resultados são expressos em unidades de absorvância por unidade de massa de amostra ou em “valor de TBA” ou “número de TBA”, definidos como a massa, em mg, de malonaldeído por kg de amostra. O valor de TBARS, substâncias reativas ao TBA, constitui-se numa outra maneira de expressar o valor obtido no teste de TBA, sendo atualmente mais utilizado e leva em consideração outras substâncias capazes de reagir com o ácido 2-tiobarbitúrico (OSAWA, FELÍCIO e GONÇALVES, 2005). Segundo Lyon *et al.* (1988), o valor de TBARS foi proposto como análise adequada para monitorar mudanças provenientes da rancidez oxidativa em carnes de frango após obtenção de correlações significativas com atributos sensoriais típicos do alimento. Outros estudos também foram conduzidos usando os valores de TBARS como indicador do processo de oxidação de carnes e derivados,

portanto, a informação do número de TBARS é bastante relevante (AHH *et al.*, 1998; HORAX *et al.*; JO *et al.*, 1999). Processos envolvidos na elaboração de produtos cárneos que incluam moagem, mistura e cozimento favorecem a formação do malonaldeído, sendo fundamental o emprego do teste na avaliação da qualidade do produto final (OSAWA, FELÍCIO e GONÇALVES, 2005). Na determinação da oxidação lipídica pelo teste de TBARS, todas as análises devem ser feitas através de um único meio de extração. Assim, a mudança dos valores de TBARS para uma situação particular ou um determinado tipo de produto cárneo pode mostrar o comportamento da oxidação dos lipídeos que ocorre durante o processamento e/ou armazenamento. Dessa maneira, pode-se, por exemplo, avaliar a eficácia de antioxidantes de diferentes fontes ou de diferentes embalagens, na estabilidade de um dado produto (RHEE, 1989; RAHARJO e SOFOS, 1993).

### **2.3 Antioxidantes**

Antioxidantes são compostos que podem prevenir ou retardar o processo oxidativo causado pelos radicais livres e pelas espécies reativas ao oxigênio (ROS) em alimentos, postergando a deterioração, rancidez e descoloração decorrente da autooxidação. Estas mudanças levam a deterioração do sabor, aroma e coloração dos alimentos, itens importantíssimos na observação do consumidor por ocasião da aquisição (MEHTA, ZAYAS e YANG, 1994). Compostos fenólicos, como metabólitos secundários, funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (ADEGOKE *et al.*, 1998; SHAHIDI, JANITA e WANASUNDARA, 1992), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Encerram múltipla ação, preservando os alimentos contra indesejáveis mudanças iniciadas em presença do oxigênio. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes são estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (NAWAR, 1985).

### 2.3.1 Antioxidantes sintéticos

Antioxidantes fenólicos sintéticos como butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxianizol (BHA), butil hidroquinona terciária (TBHQ) e propil galato (PG) são comumente adicionados em alimentos gordurosos estabilizando-os contra a oxidação (CHU e HSU, 1999; MOURE *et al.*, 2001; STAUFFER, 1996). Contudo, há uma preocupação com a utilização desses antioxidantes sintéticos devido a relatos sobre efeitos negativos, como carcinogenicidade (WHYSNER *et al.*, 1994) e toxicidade (WANASUNDARA e SHAHIDI, 1998). Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade de estes antioxidantes apresentarem efeito carcinogênico em experimentos com animais (BOTTERWECK *et al.*, 2000). Em outros estudos, o BHA mostrou induzir hiperplasia gastrointestinal em roedores por um mecanismo desconhecido em humanos (CRUCES-BLANCO *et al.*, 1999). A redução do nível de hemoglobina e a hiperplasia de células basais (MADHAVI e SALUNKHE, 1995) foram atribuídas ao uso de TBHQ. A absorção oral de BHT resulta em absorção rápida pelo trato gastrointestinal, eliminação na urina e nas fezes de ratos, camundongos e humanos (VERHAGEN *et al.*, 1989). O fígado, os pulmões e o sangue são os principais alvos de toxicidade do BHT, sendo que, em ratos, os efeitos deste sobre o fígado são mais marcantes, quando comparados ao BHA (WITCHI, 1986).

### 2.3.2 Antioxidantes naturais

Nos últimos tempos, tem-se aumentado consideravelmente o interesse em encontrar antioxidantes de ocorrência natural para uso em alimentos, visando substituir os sintéticos. (ITO *et al.*, 1983; ZHENG e WANG, 2001). Os antioxidantes sintéticos têm sido questionados ao passo que antioxidantes naturais como tocoferol, polifenóis e pigmentos carotenóides têm apresentado uma grande relevância na proteção contra oxidação lipídica. (ROMERO *et al.*, 2007). Recentemente, muitos pesquisadores têm demonstrado um grande

interesse em plantas medicinais pela seu potencial antioxidante total (DJERIDANE *et al.*, 2006; KATALINIC *et al.*, 2006; WONG *et al.*, 2006). Antioxidantes de plantas são constituídos principalmente por compostos fenólicos que são representados, na maioria das vezes por ácidos fenólicos (CAO e CAO, 1999), flavonóides (MADSEN e BERTELSEN, 1995), e catequinas (SHAHIDI, JANITHA, e WANASUNDARA, 1992). Diferentes polifenóis têm demonstrado serem potentes antioxidantes, interferindo no potencial oxidativo/antioxidativo da célula ou atuando como seqüestradores de radicais livres, como quelantes ou sequestrantes do oxigênio singlete e como desativadores de metais pró-oxidantes (PRATT, 1992; RICE-EVANS *et al.*, 1995; KÄHKÖNEN *et al.*, 1999; LODOVICI *et al.*, 2001). A ação antioxidante destes constituintes tem sido relacionada à proteção do organismo contra os radicais livres, gerados *in vivo*, os quais estão envolvidos na instalação de várias doenças degenerativas como câncer, aterosclerose, artrite reumática, desordens cardiovasculares entre outros, além da estabilidade oxidativa nos alimentos (TAPIERO *et al.*, 2002; MOURE *et al.*, 2001). Ainda, de acordo com Ames (1983); Leong e Shui (2002), o consumo de antioxidantes de origem vegetal que inibem ou aceleram a eliminação dos radicais livres, tem sido associado à baixa incidência dessas doenças em consequência do alívio do estresse oxidativo desses radicais livres.

## 2.4 Extratos

Os compostos fenólicos, como metabólitos secundários de plantas, são comumente encontrados em vários vegetais e têm demonstrado boa defesa contra o estresse oxidativo das espécies reativas ao oxigênio (ROS) endógenas e dos radicais livres. (CHOI *et al.*, 2005; KIM e CHUNG, 2002). Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos

e ligninas), eles são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e suscetíveis à ação de enzimas (KING e YOUNG, 1999).

Existem várias metodologias para preparação de extratos vegetais, visando o isolamento de seus constituintes químicos. Um método considerado adequado é o de extração hidroalcoólica (etanol/água 50/50, v/v ou metanol) para chegar ao extrato bruto. Posteriormente, este extrato pode ser submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes, buscando extração dos respectivos compostos: hexano (esteróides/terpenos/acetolenonas), diclorometano (lignanas/flavonóides metoxilados/sesquiterpenos/lactonas/ triterpenos/cumarinas), acetato de etila (flavonóides/taninos/xantonas/ácidos triterpênicos/saponinas/compostos fenólicos em geral) e butanol (flavonóides glicosilados/taninos/saponinas/carboidratos), visando uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades. Outros solventes de polaridades similares também podem ser utilizados (CECHINEL e YUNES, 1998; VOGEL, 1981). O solvente utilizado na extração e o método de extração podem influenciar significativamente no nível dos componentes recuperados, dessa maneira pode determinar a habilidade antioxidante de cada tipo de extrato (KOBÁ *et al.*, 2007; HAYOUNI *et al.*, 2007). Xu e Chang (2007) concluíram que diferentes solventes utilizados na extração, resultam em distintas composições fenólicas e seus antioxidantes. Na comparação, incluindo acetona/água (50:50, v/v), acetona/água (80:20, v/v), acetona/água/ácido acético (70:29.5:0.5, v/v/v), etanol/água (70:30, v/v), metanol/água (70:30, v/v) e etanol absoluto, a acetona/água/ácido acético (70:29.5:0.5, v/v/v), foi a formulação mais efetiva na extração fenólica e a menor atividade antioxidante foi apresentada pela extração com etanol absoluto. Extratos obtidos usando solventes de alta polaridade são mais efetivos sequestradores de radicais livres e inibidores bacterianos, do que aqueles obtidos usando solventes de menor polaridade. Os solventes mais eficientes para extração de polifenóis de *Quercus coccifera L.* e *Juniperus phoenicea L.*, foram a mistura de acetona/água/ácido acético (95:4,5:0.5, v/v/v), do que a mistura de etil acetato/metanol/água (60:30:10, v/v/v) e água (HAYOUNI *et al.*, 2007). Majhenic, Skerget e Knez (2007), ao comparar os solventes: água, metanol, acetona (35%) e etanol (60%), utilizados em sementes de guaraná,

concluíram que o extrato etanólico foi o mais eficiente como antioxidante e como antimicrobiano. Souza (2006) Trabalhando com subprodutos de *Solanum tuberosum* na extração de antioxidantes, concluiu que o extrato aquoso (hidro-etanólico) e o purificado foram efetivos no controle da oxidação lipídica em cortes de frango, porém o purificado foi mais eficaz, sob este aspecto e não diferiu do controle na análise sensorial.

## 2.5 Marcela

*Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C., popularmente conhecida como “marcela” ou “macela”, é uma erva usada na Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil por suas propriedades medicinais de largo uso, cujas propriedades despertam interesse da indústria farmacêutica. Infusões de inflorescências de *Achyrocline satureioides* são utilizadas comumente na medicina popular brasileira como digestivo, anti-espasmódico, anti-inflamatório, agente hipoglicêmico e como redutor dos níveis de colesterol sanguíneo (SIMÕES *et al.*, 1988). Estudos da composição química demonstraram que o extrato etanólico das inflorescências da marcela tem como principais constituintes os flavonóides quercetina, 3-O-metilquercetina e luteolina. De forma similar, estudos fitoquímicos confirmaram a presença de ácido caféico, clorogênico e isoclorogênico (FERRARO, NORBEDO e COUSSIO, 1981; SIMÕES, 1984). As propriedades bioquímicas dos polifenóis como flavonóides e ácido caféico têm atraído muitos pesquisadores da biologia e da medicina. Os flavonóides são descritos como seqüestradores do ânion superóxido, de hidroxilas, de radicais peroxi e como inibidores de enzimas chave na respiração mitocondrial. Eles também são conhecidos como inibidores da oxidação de proteínas de baixa densidade. Em complemento, a quercitina é um dos principais flavonóides presentes na marcela e foi descrita como inibidora da peroxidação lipídica através de sequestradores de ROS e quelante de íons metálicos, responsáveis pela geração das ROS (OHSHIMA *et al.*, 1998; DI CARLO *et al.*, 1999; YAMAMOTO *et al.*, 1999; HARBONE e WILLIAMS, 2000; ISHIGE, SCHUBERT e SAGARA, 2001). Verificou-se que tanto o extrato

aquoso quanto o metanólico de marcela reduziram a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em homogêneos de fígado de ratos (DESMARCHELIER, COUSSIO e CICCIA, 1998). Em estudo epidemiológico com dietas de antioxidantes na incidência de doenças neurodegenerativas, Arredondo *et al.* (2004) concluíram que os flavonóides quercetina e luteolina, contidos na infusão de *Achyrocline satureioides*, foram responsáveis por efeito citoprotetor. O resultado obtido por estes pesquisadores sugere que o extrato de marcela possui significativa capacidade para carrear radicais livres. Segundo Campagnol (2007), o uso de extrato hidro-etanólico de marcela à 1% em salame controlou a oxidação lipídica, mantendo o produto com baixos valores de TBARS, porém reduziu significativamente os valores de aceitação em prova sensorial.

## 2.6 Erva mate

*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Aquifoliaceae) é conhecida popularmente como erva mate. É nativa de regiões de clima temperado, resiste a baixas temperaturas e sua área de ocorrência natural é restrita ao Brasil, Paraguai e Argentina (Anuário Brasileiro da Erva-mate, 1999).

De acordo com Canterle (2005), a erva mate, ingerida na forma de chimarrão, possui ótimo efeito antioxidante em sistemas vivos e em sistemas químicos. A infusão de folhas de *Ilex paraguariensis* (Mate) possui conteúdo de polifenóis comparável ao chá preto e ao suco de laranja, e quando submetido à normalização para o conteúdo de polifenóis totais da bebida, apresenta atividade antioxidante ligeiramente maior que vinhos, suco de laranja e chá preto. Na análise do extrato de folhas mate em cromatografia líquida de espectro de massa (LC/MS), verificou-se que os isômeros do ácido cafeoilquínico (CQA) e o di-cafeoilquínico (di-QCA) foram os maiores componentes da fração fenólica (BRAVO, GOYA e LECUMBERRY, 2007). Estes são constituintes da família dos ácidos clorogênicos, que são os mais conhecidos grupos de compostos fenólicos de *Ilex paraguariensis*. A presença de rutina, quercetina e camferol, ambos livres ou como glicosídeos, em várias



espécies *Ilex*, incluindo *I. paraguariensis*, podem também ser responsáveis, em parte, pela atividade antioxidante observada na erva mate (ALIKARIDIS, 1987; FILIP *et al.*, 2001). Filip *et al.* (2007) concluíram que a cafeína e o ácido clorogênico do extrato aquoso de erva mate tem um importante papel na inferência de secreção da peroxidase, pela glândula submandibular de ratos, conferindo defesa contra alterações imunológicas e inflamatórias da cavidade oral. O extrato aquoso de folhas contém significativamente mais alto nível de compostos fenólicos que o de extrato aquoso de erva mate comercial e este apresentou atividade peroxidase respectivamente maior (ANESINI, FERRARO e FILIP, 2006). Campos *et al.* (2007) trabalhando com salame, concluíram que a adição de extrato hidro-etanólico de erva mate controlou a oxidação lipídica mantendo o produto cárneo com baixos valores de TBARS.

### **3 ARTIGO CIENTÍFICO**

#### **3.1 ARTIGO 1**

## **EFEITO DOS EXTRATOS HIDRO-ETANÓLICOS DE ERVA MATE (*Ilex paraguariensis*) E DE MARCELA (*Achyrocline satureioides*) NA INIBIÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA E NA COLORAÇÃO DE BANHA SUÍNA<sup>1</sup>**

**Eduardo Borges de Brum<sup>2</sup>, Nelcindo Nascimento Terra<sup>3,\*</sup>, Leadir Lucy Martins Fries<sup>3</sup>, Ernesto Hashime Kubota<sup>3</sup>, Danielli Vacari de Brum<sup>4</sup>, Liana Inês Guidolin Milani<sup>3</sup>**

Em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP.

---

<sup>1</sup> Manuscrito recebido em

<sup>2</sup> Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CCR, UFSM.

<sup>3</sup> Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: nelcindo@terra.com.br

<sup>4</sup> Graduação em Matemática.

\* A quem a correspondência deve ser enviada.

## RESUMO

O efeito de dois níveis (0,5% e 1%) de extratos hidro-etanólicos de erva mate (*Ilex paraguariensis*) e de marcela (*Achyrocline satureioides*), bem como da composição mista de extratos de erva mate e marcela (1/1:v/v), na inibição da oxidação lipídica e a interferência na colorimetria (CLab) da banha suína foram avaliados. A atividade antioxidante foi elevada para todos os extratos e composições mistas de extratos. Observaram-se valores entre 91,86 e 99,15% na inibição da oxidação lipídica, no teste de oxidação acelerada. Não foi observado efeito sinérgico, nem antagônico, na composição mista de extratos de erva mate e de marcela (1/1:v/v) sobre a inibição da oxidação. Na análise da colorimetria das coordenadas  $a^*$  e  $b^*$ , os extratos de erva mate, de marcela e as composições mistas de extratos (0,5% e 1%) apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (sem extrato) e o extrato de erva mate a 1% obteve o valor mais alto, diferenciando-se significativamente ( $p < 0,05$ ) dos demais, indicando uma maior interferência na cor da banha suína. Notou-se que quanto à coordenada  $L^*$ , o controle, as composições mistas de extratos (0,5% e 1%) e o extrato de marcela (0,5%) não demonstraram diferença significativa ( $p > 0,05$ ), indicando não haver interferência, na luminosidade da banha suína. Os demais extratos e composições se diferenciaram do controle ( $p < 0,05$ ), interferindo neste parâmetro sobre a banha suína.

**Palavras-chave:** oxidação; banha suína; erva mate; marcela; antioxidante

## ABSTRACT

The effect of two levels (0,5% and 1%) of hydro-ethanolic extracts of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and marcela (*Achyrocline satureioides*) and mixed composition of extracts of mate and marcela (1/1:v/v) in the inhibition of lipid oxidation and interference in the colorimetric (CLab) of porcine barth were evaluated. The antioxidant activity was high for all the extracts and compositions of mixed extracts. Values were observed between 91.86 and 99.15% of the inhibition of lipid oxidation in accelerated oxidation test. There was no synergistic effect or antagonistic, the composition of mixed extracts of mate and marcela (1/1:v/v) on the inhibition of oxidation. In the analysis of colorimetric coordinates  $a^*$  and  $b^*$ , the extracts of yerba mate, and the compositions of marcela mixed extracts (0,5% and 1%) showed significant difference ( $p < 0,05$ ) compared to control (without extract) and the extract of yerba mate (1%) obtained the highest value, differentiating it significantly ( $p < 0,05$ ) of the others, indicating greater interference in the color of porcine barth. It was noted that on the  $L^*$  coordinate, control, the mixed compositions of extracts (0,5% and 1%) and extract of marcela (0,5%) showed no significant difference ( $p > 0,05$ ), indicating no interference in the light of porcine barth. The other extracts and compositions differ from the control ( $p < 0,05$ ), interfering in this parameter on the porcine barth.

**Keywords:** oxidation; porcine barth; yerba mate; marcela; antioxidant

## 1 INTRODUÇÃO

A preocupação em proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade tem levado a indústria de produtos cárneos a adotar medidas que limitem o fenômeno da oxidação lipídica, pois esta acarreta alterações organolépticas nos produtos, tais como: alterações da coloração da carne e da gordura, desenvolvimento de sabor e aroma desagradáveis, tornando os alimentos impróprios para o consumo, além de também provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos como os compostos da oxidação do colesterol (KUBOW, 1990; PANIANGVAIT *et al.*, 1995) e da polimerização dos triglicerídeos (ALEXANDER, 1978; CHANG, PETERSON e HO, 1978), além dos aldeídos com  $\alpha$  e  $\beta$  insaturações, incluindo o malonaldeído, que é reconhecido por seus efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (NEWBURG e CONCON, 1980).

Compostos químicos conhecidos como antioxidantes são empregados com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos gordurosos. A adição de antioxidantes sintéticos como o BHA, BHT, PG e TBHQ é uma prática corrente na indústria de produtos cárneos e o uso desses aditivos tem sido questionado pela possibilidade de efeitos colaterais maléficos à saúde. Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem efeito carcinogênico em experimentos com animais (BOTTERWECK *et al.*, 2000). Em outros estudos, o BHA mostrou induzir hiperplasia gastrointestinal em roedores por um mecanismo desconhecido em humanos (CRUCES-BLANCO *et al.*, 1999). A redução do nível de hemoglobina e a hiperplasia de células basais (MADHAVI e SALUNKHE, 1995) foram atribuídas ao uso de TBHQ. Por estes motivos, o uso destes antioxidantes em alimentos é limitado. No Brasil, o uso destes antioxidantes é controlado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA) que limita a 0,01g/100g para BHA e BHT como concentrações máximas permitidas em carnes e produtos cárneos (BRASIL, 1998).

A utilização de plantas e ervas como antioxidantes em alimentos processados está tornando-se cada vez mais importante na indústria da alimentação como uma alternativa aos antioxidantes sintéticos (ITO *et al.*, 1983; MADSEN e BERTELSEN, 1995; ZHENG e WANG, 2001). A presença de compostos fenólicos em plantas tem sido muito estudada pela inibição da oxidação lipídica, além da participação em processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos (PELEG, BODINE e NOBLE, 1998), porém há necessidade de se trabalhar na busca pela melhor forma de utilização dos vegetais para esta finalidade, haja vista que os extratos elaborados têm apresentado bons resultados quanto à atividade antioxidante, porém apresentaram interferências nas características sensoriais dos produtos.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), planta muito comercializada no norte da Argentina, sul do Brasil e leste do Paraguai (GIBERTI, 1979), na forma de pó de folhas tostadas, detém propriedades antioxidantes e apresenta efeito hipocolesterolêmico em função da redução da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), minimizando a formação do ateroma, característica essa atribuída aos constituintes fenólicos presentes nas folhas (SANTOS *et al.*, 2004). Derivados cafeicos e flavonóides foram identificados e quantificados, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em extrato aquoso das folhas de erva-mate (FILIP *et al.*, 2001).

A *Achyrocline satureioides*, popularmente conhecida como marcela, é uma planta medicinal usada na Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil por suas propriedades antiespasmódica, hepatoprotetora e colerética, possui alto conteúdo de compostos polifenólicos, na maioria flavonóides, e de diferentes ácidos fenólicos como o cafeico, clorogênico e isoclorogênico (SIMÕES *et al.*, 1988; FERRARO, NORBEDO e COUSSIO, 1981), sugerindo que esta planta pode possuir potentes efeitos antioxidantes. Desmarchelier, Coussio e Ciccia (1998); Gugliucci e Menini (2002) relataram propriedades antioxidantes da marcela, mas a sua aplicação em produtos cárneos ainda tem sido pouco estudada.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito dos extratos hidroetanólicos de marcela (*Achyrocline satureioides*), de erva mate (*Ilex paraguariensis*) e a composição mista de extratos de erva mate e de marcela (1/1, v/v) na inibição da oxidação lipídica e na colorimetria de banha suína.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local e período experimental**

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria e no Laboratório de Inspeção de Alimentos e Bromatologia - LIAB do Depósito de Subsistência de Santo Ângelo, do Exército Brasileiro, no período de fevereiro a outubro de 2008.

### **2.2 Matéria-prima**

Para elaboração dos extratos foram utilizadas amostras de inflorescências de marcela (*Achyrocline satureioides*), colhidas durante o mês de março, na zona rural de Santiago-RS-Brasil e amostras de erva mate (*Ilex paraguariensis*) comercial, adquiridas em um supermercado de Santo Ângelo-RS-Brasil, no mesmo período.

### **2.3 Preparação do extrato de marcela**

O produto vegetal seco (30 gramas) de inflorescências da marcela, foi homogeneizado com solvente, transferido para um béquer e deixado durante 1 hora à temperatura ambiente. Transcorrido este período, procedeu-se a filtração utilizando-se papel de filtro Whatman nº 1. A parte sólida foi submetida a mais duas extrações sucessivas, com o objetivo de extrair totalmente o princípio ativo da matéria prima. Os 3 filtrados foram recolhidos e concentrados em rotaevaporador (Rotavapor® RE 120 - Büchi, Flawil, Suíça) até 7% do volume inicial, obtendo-se assim o extrato bruto que foi mantido sob refrigeração em frasco de vidro, ao abrigo da luz. Na elaboração do extrato, a relação líquido-sólido foi de 12:1. Na primeira extração, o solvente empregado foi uma mistura de etanol 95% com água destilada (12:1) e nas duas seguintes etanol 95% (CAMPAGNOL, 2007).

### **2.4 Preparação do extrato de erva mate**

O pó de folhas secas (100 gramas) de erva mate foi homogeneizado em 400 ml de uma mistura de etanol a 95% e água destilada (4/1, v/v) durante 3 minutos. Logo após, a mistura foi agitada durante 1 hora sob temperatura ambiente. Em seguida foi filtrado através de papel filtro Whatman nº 1. A parte sólida foi reextraída com etanol por mais duas vezes. Os 3 filtrados foram recolhidos e concentrados em rotaevaporador (Rotavapor® RE 120 - Büchi, Flawil, Suíça) até 7% do volume inicial, obtendo-se assim o extrato bruto que foi mantido sob refrigeração em frasco de vidro, ao abrigo da luz (CAMPOS *et al.*, 2007).

## 2.5 Teste da oxidação acelerada em banha suína

Foram pesados 100 gramas de banha suína em um becker e adicionados do extrato (0,5 ou 1 grama), no controle não foi adicionado extrato. A composição foi aquecida e mantida a temperatura entre 100-110°C durante 90 minutos, sob agitação com auxílio de agitador magnético. Depois de decorrido este tempo, foi realizada a análise do índice de TBARS nas amostras, com leitura da absorbância a 531nm (PADILHA, 2007). A atividade antioxidante das concentrações foi calculada em relação à percentagem de inibição da oxidação na banha suína, pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 1 - \frac{(\text{absorbância da amostra})}{(\text{absorbância do controle})} \times 100 \quad (1.1)$$

## 2.6 TBARS

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) resultantes da oxidação lipídica foram determinadas segundo o método de Raharjo e Sofos (1993). Os valores de TBARS foram determinados em triplicata para cada amostra.

## 2.7 Composição das amostras

Cada amostra foi composta através da adição de alíquotas pré-determinadas de extrato a 100g de banha suína, em becker, dando origem as seguintes composições:

- extrato de erva mate a 0,5% (E0.5);
- extrato de erva mate a 1% (E1);
- extrato de marcela a 0,5% (M0.5);



- extrato de marcela a 1% (M1);
- composição mista de extratos de erva mate e de marcela (1/1, v/v) a 0,5% (EM0.5);
- composição mista de extratos de erva mate e de marcela (1/1, v/v) a 1% (EM1).

## **2.8 Determinação da cor**

A determinação da cor foi realizada pelo aparelho Minolta Chroma Meter CR- 300, (MINOLTA). Os resultados foram expressos como L\* (luminosidade), a\* (direção para o vermelho) e b\* (direção para o amarelo).

## **2.9 Análise estatística**

Todas as determinações foram realizadas em triplicata, os dados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), utilizando o pacote estatístico SAS, versão 8.2 (SAS, 1996).

# **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **3.1 Colorimetria**

Os resultados da análise colorimétrica dos extratos adicionados em banha suína estão descritos na tabela 1. Na coordenada a\* os extratos hidro-

etanólicos de erva mate e de marcela apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle/sem extrato e o E1 obteve o valor mais alto, diferenciando-se significativamente ( $p < 0,05$ ) dos demais, indicando uma maior interferência na cor, em direção ao vermelho, da banha suína. O M0.5 e o EM0.5, apresentaram os menores valores a partir do controle, respectivamente, demonstrando as menores interferências, neste parâmetro, sobre a banha suína. O E0.5, o M1 e o EM1 apresentaram valores intermediários e com interferência crescente, respectivamente, sobre o produto avaliado.

**Tabela 1** – Valores médios da determinação colorimétrica de amostras de banha suína com diferentes níveis de extratos de erva mate, de marcela e da composição mista de extratos de erva mate e de marcela (1/1, v/v) expressas como L\* (luminosidade), a\* (direção ao vermelho) e b\* (direção ao amarelo)

Tratamentos <sup>1</sup>	L*	a*	b*
Controle	90,27 <sup>a</sup>	8,06 <sup>e</sup>	10,80 <sup>e</sup>
E0.5	86,97 <sup>c</sup>	26,40 <sup>c</sup>	14,50 <sup>d</sup>
E1	84,52 <sup>d</sup>	49,26 <sup>a</sup>	18,99 <sup>a</sup>
M0.5	88,79 <sup>ab</sup>	17,73 <sup>d</sup>	17,58 <sup>b</sup>
M1	84,95 <sup>d</sup>	31,23 <sup>b</sup>	16,20 <sup>c</sup>
EM0.5	88,70 <sup>ab</sup>	17,30 <sup>d</sup>	17,38 <sup>bc</sup>
EM1	87,50 <sup>ab</sup>	33,56 <sup>b</sup>	17,25 <sup>bc</sup>

Médias acompanhadas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup> Controle: sem adição de extrato; E0.5: adição de 0,5% de extrato hidro-etanólico de erva mate; E1: adição de 1% de extrato hidro-etanólico de erva mate; M0.5: adição de 0,5% de extrato hidro-etanólico de marcela; M1: adição de 1% de extrato hidro-etanólico de marcela; EM0.5: adição de 0,5% de composição mista de extratos hidro-etanólicos de erva mate e marcela; EM1: adição de 1% de composição mista de extratos hidro-etanólicos de erva mate e marcela.

Na análise da coordenada colorimétrica b\* novamente os extratos hidro-etanólicos de erva mate e de marcela apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle/sem extrato, porém quando foram comparadas as concentrações, o E0.5 obteve o valor mais baixo a partir do controle, demonstrando a menor interferência neste parâmetro, sobre a banha suína. O E1 apresentou diferença ( $p < 0,05$ ) em relação a todos tratamentos e indicou uma maior interferência na cor, em direção ao amarelo,

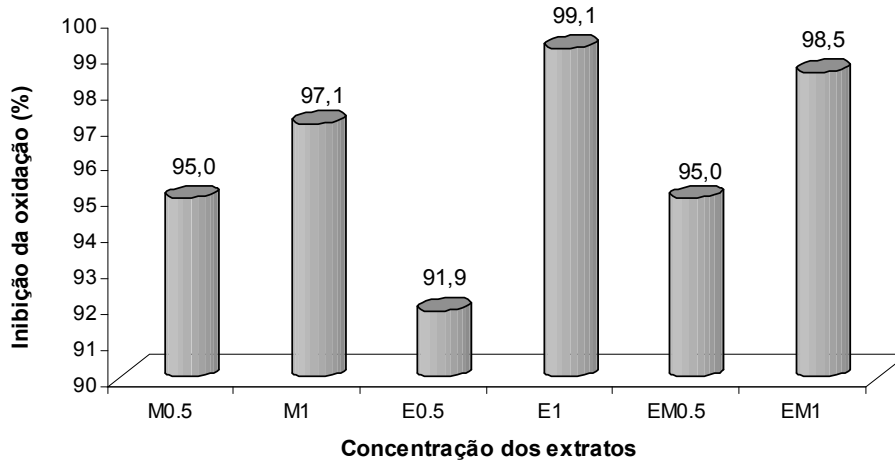
do produto analisado. O M1 e o M0.5, bem como o EM1 e o EM0.5 apresentaram valores intermediários para este parâmetro. Segundo Fennema (2000), o processamento térmico de vegetais com folhas verdes modifica cor, de verde para verde amarronzado, devido a conversão da clorofila em feofitina, sendo transferida ao produto adicionado.

Observou-se que quanto à coordenada  $L^*$ , o controle, o M0.5, o EM0.5 e o EM1 não demonstraram diferença significativa ( $p > 0,05$ ), indicando não haver interferência, na luminosidade, da banha suína. Campagnol (2007), da mesma forma, não observou diferença significativa quanto coordenada  $L^*$ , entre produtos cárneos adicionados ao extrato hidro-alcoólico de marcela e o controle, em salame. Os demais extratos e composições mistas se diferenciaram do controle ( $p < 0,05$ ), interferindo neste parâmetro sobre a banha suína.

### 3.2 Atividade antioxidante

Na Figura 1 estão descritos os resultados da atividade antioxidante dos extratos hidro-etanólicos de marcela, de erva mate e das composições mistas de extratos (1/1, v/v), em relação à inibição da oxidação, acompanhada no teste de oxidação acelerada em banha suína. Observou-se que a taxa de inibição da oxidação foi elevada para as diferentes formulações, porém não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre si. Foram encontrados valores entre 91,86 e 99,15% na inibição da oxidação lipídica, no teste de oxidação acelerada em banha suína.

Estes resultados estão de acordo com Anesini, Ferraro e Filip (2006); Bravo, Goya e Lecumberry (2007); Campos *et al.* (2007), que encontraram excelente atividade antioxidante no extrato de erva mate, e com Campagnol (2007) que encontrou, da mesma forma para o extrato de marcela. Souza (2006) trabalhando com extrato hidro-etanólico bruto e purificado de casca de batata inglesa (*Solanum tuberosum*) encontrou valores entre 84% e 94% na inibição da oxidação lipídica em teste semelhante ao utilizado neste trabalho.



**Figura 1** - Atividade antioxidante dos extratos hidro-etanólicos de marcela a 0,5% (M0.5) e a 1% (M1), de erva mate a 0,5% (E0.5) e a 1% (E1), das composições mistas de extratos (1/1, v/v) a 0,5% (EM0.5) e a 1% (EM1), em relação a inibição da oxidação, acompanhada no teste de oxidação acelerada em banha suína. Dados expressos pela média (n=3)

No teste de oxidação acelerada os controles oxidaram até o nível médio de 1,942 mg de malonaldeído/Kg de amostra, demonstrando, dessa forma, a eficácia dos extratos na inibição da oxidação lipídica.

Por outro lado, a atividade antioxidante de fitoquímicos naturais pode ser influenciada pelo solvente utilizado na extração e pelo método de extração dos compostos ativos, que podem interferir significativamente no nível dos componentes recuperados (MOLLER *et al.* (1999); KOBAYASHI *et al.* (2007); HAYOUNI *et al.* (2007). Estudos da composição química demonstraram que o extrato etanólico das inflorescências da marcela tem como principais constituintes os flavonóides quercetina, 3-O-metilquercetina e luteolina. De forma similar, estudos fitoquímicos confirmaram a presença de ácido caféico, clorogênico e isoclorogênico (FERRARO, NORBEDO e COUSSIO, 1981; SIMÕES, 1984). Na análise do extrato de folhas mate em cromatografia líquida de espectro de massa (LC/MS), verificou-se que os isômeros do ácido cafeoilquínico (CQA) e o di-cafeoilquínico (di-QCA) foram os maiores componentes da fração fenólica (BRAVO, GOYA e LECUMBERRY, 2007). Estes são constituintes da família dos ácidos clorogênicos, que são os mais conhecidos grupos de compostos fenólicos de *Ilex paraguariensis*

(ALIKARIDIS, 1987; FILIP *et al.*, 2001). Estes compostos fenólicos, como metabólitos têm demonstrado boa defesa contra o estresse oxidativo das espécies reativas ao oxigênio (ROS) endógenas e dos radicais livres. (CHOI *et al.*, 2005; KIM e CHUNG, 2002).

Ainda, não foi constatado efeito sinérgico resultante da mistura de extratos de erva mate e marcela, já que não houve diferença significativa entre estes e os extratos puros sobre o percentual de inibição de oxidação. Da mesma forma, não houve antagonismo quanto ao efeito antioxidante na mistura de extratos.

## 4 CONCLUSÃO

Os extratos hidro-etanólicos de erva mate, de marcela e as composições mistas de extratos (1/1:v/v), ambos a 0,5% e 1% em banha suína, apresentaram elevada atividade antioxidante e não foi observado efeito sinérgico, nem antagônico, na composição mista de extratos (1/1:v/v) de erva mate e marcela sobre a inibição da oxidação lipídica.

Os extratos de erva mate, de marcela e as composições mistas de extratos (0,5% e 1%), na análise da colorimetria das coordenadas  $a^*$  e  $b^*$ , apresentaram interferência em relação ao controle-sem extrato, sendo que o extrato de erva mate a 1% obteve o mais alto valor, indicando uma maior interferência na cor da banha suína. Quanto à coordenada  $L^*$ , o controle, as composições mistas de extratos e o extrato de marcela a 0,5% não indicaram interferência, na luminosidade, da banha suína.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, J. C. Biological effects due to changes in fats during heating. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 55, n. 10, p. 711–717, 1978.

ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, p. 121–144, 1987.

ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. **Food Chemistry**, v. 97, p. 459–464, 2006.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R. A.; KLEINJANS, J. **Food Chem. Toxicol.** v. 38, n. 599, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1.004, de 11 de dezembro de 1998. Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Poder Executivo, 14 dez. 1998.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate. **Food Research International**, v. 40, p. 393–405, 2007.

CAMPAGNOL, P.C.B. **Cultura starter produzida em meio de cultura de plasma de suíno e antioxidante natural na elaboração do salame**. 2007. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

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

CHANG, S. S.; PETERSON, R. J.; HO, C. T. Chemical reactions involved in the deep-fat frying of foods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 55, n. 10, p. 718–727, 1978.

CHOI, J.M.; RYU, H.J.; CHUNG, J.H.; PARK, J.C.; HWANG, J.K.; SHIN, D.B., *et al.* Antioxidant property of genistein: inhibitory effect on HOCl induced protein degradation, DNA cleavage, and cell death. **Food Science and Biotechnology**, v. 14, p. 399–404, 2005.

CRUCES-BLANCO, C.; CARRETERO, A. S.; BOYLE, E. M.; GUTIÉRREZ, A. F. **Talanta**, n. 50, p. 1099, 1999.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. ("marcela"). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 9, p. 1163-1170, 1998.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2. ed., Zaragoza: Editorial Acribia, 2000. 1258 p.

FERRARO, G. E.; NORBEDO, C.; COUSSIO, J. D.; Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 2053–2054, 1981.

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

GIBERTI, G. Las especies argentinas del género *Ilex* (Aquifoliaceae). **Darwiniana**, n. 22, p. 217–240, 1979.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides*. **Life Sciences**, v. 71, n. 6, p. 693-705, 2002.

HAYOUNI, E. A.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, M.; HAMDY, M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. **Food Chemistry**. V. 105, n. 3, p. 1126-1134, 2007.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; HASEGAWA, A.; SHIBATA, M.; OGISO, T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F 344 rats. **Journal of The National Cancer Institute**, v. 70, p. 343–347, 1983.

KIM, Y. C.; CHUNG, S. K. Reactive oxygen radical species scavenging effects of Korean medicinal plant leaves. **Food Science and Biotechnology**, v. 11, p. 407–411, 2002.

KOBA, K.; MATSOUKA, A.; OSADA, K.; HUANG, Y. Effect of loquat (*Eriobotrya japonica*) extracts on LDL oxidation. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 308-316, 2007.

KUBOW, S. Toxicity of dietary lipid peroxidation products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 1, p. 67–71, 1990.

MADHAVI, D. L.; SALUNKHE, D. K. **Em Antioxidants**; Maga, J.; Tu, A. T., eds.; Marcel Dekker: New York, 1995, 89 p.

MADSEN, H. L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 271–277. 1995.

MOLLER, J. K. S. *et al.* Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. **Food Chemistry**, v. 64, p. 215-219. 1999.

NEWBURG, D. S.; CONCON, J. M. Malonaldehyde concentrations in food are affected by cooking conditions. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 6, p. 1681–1687, 1980.

PADILHA, A. D. G. **Antioxidante natural na conservação de carne de frango in vivo**. 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

PANIANGVAIT, P.; KING, A. J.; JONES, A. D.; GERMAN, B. G. Cholesterol oxides in foods of animal origin. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1159– 1174, 1995.

PELEG, H.; BODINE, K.K.; NOBLE, A. C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, v. 23, n. 3, p. 371-378, 1998.

RAHARJO, S; SOFOS, J. N. Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: A review. **Meat Science**, v. 35, n. 2, p. 145-169, 1993.

SANTOS, K. A.; FREITAS, R. J. S.; RAPACCI, M.; WINTER, C. M. G. Polifenóis em chá de erva-mate. **Nutrição Brasil**, v. 3, n. 1, p. 47-50, 2004.

SAS. **Sas Institute Inc.** Cary, NC, 1996.

SIMÕES, C. M. O. **Investigação químico-farmacológica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (Marcela)**. 1984. 186 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Rio grande do Sul, Porto Alegre, 1984.



SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., compositae. **Journal of ethnopharmacology**, v. 22, n. 3, p. 281-293, 1988.

SOUZA, M. A. V. **Casca da batata inglesa (*Solanum tuberosum*) na proteção antioxidante da carne de frango**. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, p. 5165-5170, 2001.

### 3.2 ARTIGO 2

## **NATURAL ANTIOXIDANT OF YERBA MATE (*Ilex paraguariensis*) AND MARCELA (*Achyrocline satureioides*) IN AND THE DEVELOPMENT OF TUSCANY SAUSAGE <sup>5</sup>**

**Eduardo B. de Brum <sup>6</sup>, Nelcindo N. Terra <sup>7,\*</sup>, Leadir L. M. Fries <sup>7</sup>,  
Danielli V. de Brum <sup>8</sup>, Liana I. G. Milani <sup>7</sup>**

Em fase final de revisão para ser submetido à Meat Science.

---

<sup>5</sup> Manuscrito recebido em

<sup>6</sup> Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CCR, UFSM.

<sup>7</sup> Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: nelcindo@terra.com.br

<sup>8</sup> Graduação em Matemática.

\* A quem a correspondência deve ser enviada.

## ABSTRACT

The effect of adding a level (0,5%) of hydro-ethanolic extract or purified extract from yerba mate (*Ilex paraguariensis*), of hydro-ethanolic extract or purified extract from marcela (*Achyrocline satureioides*) on security (TBARS values) and quality (pH and attributes sensory) and microbiology (aerobic mesophilic, coliforms to 45 °C/g, *Staphylococcus* coagulase positive, *Clostridium* Sulphite reducing to 46 °C, and *Salmonella* sp) of tuscan sausages was evaluated. All treatments showed lipid stability during storage at 4 °C, except the control of oxidation process that began at 30 days. There was no interference of the addition of the extracts on the pH of the sausages compared with control. In sensory analysis the hydro-ethanolic extract of yerba mate interfered ( $p < 0,05$ ) in comparison to the control, the other extracts did not interfere ( $p > 0,05$ ). In the microbiological tests, during the storage period studied, under refrigeration at 4° C, the count of *Clostridium* Sulphite reducing to 46° C was lower than  $1 \times 10^1$  CFU. g<sup>-1</sup>, the *Staphylococcus* coagulase positive was lower than  $1 \times 10^2$  CFU. g<sup>-1</sup>, coliforms to 45° C was lower than  $1 \times 10^1$  CFU. g<sup>-1</sup> and the *Salmonella* sp was absent in 25 g. The initial count of mesophilic aerobes found in the formulation of sausage for all treatments was below  $10^6$  CFU. g<sup>-1</sup>, cited by Terra (1998) as acceptable range of microbiological contamination. During the storage of sausages suffered minor oscillations with a reduction of the counts of mesophilic aerobes on day 12 and progressive increases. In the final period of storage, from 30 days, there was a process of bacterial growth in all samples, except in sausages added to hydro-ethanolic extract of marcela. The addition of 0,5% of purified extract of yerba mate, hydro-ethanolic extract of marcela or purified extract of marcela can be used in the preparation of tuscan sausages, providing safer products for consumers.

**Keywords:** tuscan sausages; yerba mate; marcela; lipid oxidation

## 1 INTRODUCTION

Recently, many researchers have demonstrated a great interest in medicinal plants by their concentrations of phenolic compounds related to total antioxidant potential (DJERIDANE *et al.*; KATALINIC *et al.*; WONG *et al.*; SOUZA, 2006, CAMPAGNOL; PADILHA; CAMPOS *et al.*, 2007) and have worked on the separation, identification, quantification of phenolic compounds in foods, experiencing many methodological problems, because, in addition to encompass a wide range of substances (simple phenols, phenolic acids,

coumarins flavonoids, tannin and lignin), they are in most cases, large-polarity, many reactive and susceptible to the action of enzyme (KING & YOUNG, 1999).

The health impact of antioxidants in foods and the hazardous effects of synthetic preservatives have led to active research in the field of natural antioxidants (MARTHA-ESTRELLA, NIOKHOR & STEVANOVIC, 2007).

Processed meat products, such as sausage, frankfurter, salami, hamburger and meatballs, are highly appreciated by the population. However, the lipid components are susceptible to attack by molecular oxygen, resulting in lipid oxidation with the generation of cholesterol oxides and alteration of fatty acids. (BAGGIO e BRAGAGNOLO, 2006)

Phenolic compounds, such as secondary metabolites of plants, are commonly found in many plants and have shown good protection against the oxidative stress of endogenous ROS and free radicals. (CHOI *et al.*, 2005; KIM & CHUNG, 2002).

*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Aquafoliaceae) is known popularly as yerba mate. It is native to temperate climate regions, resists to low temperature, and its natural occurrence area is restricted to Brazil, Paraguay, and Argentina (Anuário Brasileiro da Erva-mate, 1999). Among the phenolic compounds are referred to the high content of caffeoylquinic derivatives such as chlorogenic acid and its isomers, which he attributed to astringent and antioxidant action of the product (CLIFFORD & RAMIREZ-MARTINEZ, 1990). In addition to chlorogenic acid, the flavonoid rutin, luteolin, diglicoside of luteolin, tannins and cafeoilglicose are present in the hydro-ethanolic extract of yerba mate (FILIP *et al.*, 2001). Antioxidant activity of *Ilex* species was previously demonstrated in others systems (FILIP & FERRARO, 2003). The potential as antioxidants *I. paraguariensis* and “Yerba Mate” hydro-ethanolic extracts, commonly used by people, as reported by Anesini, Ferraro & Filip (2006); Campos *et al.* (2007).

*Achyrocline satureioides* known popularly as marcela ou macela, is an herb used in Argentina, Uruguay, Paraguay and Brazil for its antispasmodic properties and protective liver. Studies on the chemical showed that the ethanol extract of inflorescences is main constituents the flavonoids quercetin, 3-O-metilquercetin and luteolin. Similarly, phytochemical studies have

confirmed the presence of caffeic acid, chlorogenic and isochlorogenic (FERRARO, NORBEDO & COUSSIO, 1981; SIMÕES, 1984). The extracts of *A. satureioides* possess significant antioxidant activity (DESMARCHELIER, COUSSIO & CICCIA, 1998; CAMPAGNOL, 2007).

The objective of this study was to evaluate the use of hydro-ethanolic extract and purified from *Achyrocline satureioides* (marcela) and *Ilex paraguariensis* (yerba mate) to 0,5%, added in tuscan sausage, with analysis of lipid stability (TBARS values), quality (pH and sensory attributes) and microbiology (aerobic mesophilic, coliforms to 45 °C/g, *Staphylococcus* coagulase positive, *Clostridium* Sulphite reducing to 46 °C and *Salmonella* sp).

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Preparation of yerba mate hydro-ethanolic extract (YMA)

Yerba mate hydro-ethanolic extract was obtained from dried and powdered leaves of *Ilex paraguariensis*. One hundred grammes of these leaves were homogenised in 400 ml of a mixture of ethanol 95%/water (4/1, v/v) for 3 min and left for 1 h at room temperature. After that, the homogenate was filtered through a Whatman No. 1 filter paper. Then, the solid phase was twice reextracted using ethanol as solvent. Ethanolic extracts were collected all together and solvent was eliminated in a Rotavapor® (RE 120 - Büchi, Flawil, Switzerland). One hundred grams of dried and powdered yerba mate leaves gave rise to 89,3 ml of extract. The extraction was done using amber glass. Samples were maintained at 4 °C and protected from light (CAMPOS *et al.*, 2007).

## **2.2 Preparation of marcela hydro-ethanolic extract (MA)**

The dried plant product (inflorescences of marcela) was mixed with solvent, and transferred to a becker for 1 hour at room temperature. After this period has to filter. The solid part was subjected to two successive extractions, with the aim of extracting the active principle of the full material. The 3 filtrates were collected and concentrated on Rotavapor® (RE 120 - Büchi, Flawil, Switzerland) up to 7% of initial volume, resulting in a crude hydro-ethanolic extract which was kept under refrigeration in glass bottle, in the dark. In preparing to extract liquid-solid ratio was 12:1. In the first extraction solvent used was a mixture of 95% ethanol with distilled water (12:1) and in the two following 95% ethanol. Samples were maintained at 4 °C and protected from light (CAMPAGNOL, 2007).

## **2.3 Preparation of yerba mate purified extract (YMP) and marcela purified extract (MP)**

The purified extract was obtained through a sequential separation, using solvents of increasing polarity, according Simões (2007). For this, we used funnels where the separation of hydro-ethanolic extract was placed in contact, sequentially, with the solvent in the following order: hexane, chloroform and ethyl acetate. So on the first mixed up the funnel: extract + hexane, is under by shaking and homogenized, after separating the fraction hexane extract was reserved and transferred to a second funnel which has been obtained fraction chloroform and so on until the fraction of ethyl acetate, which was submitted to the evaporation of the solvent on Rotavapor® (RE 120 - Büchi, Flawil, Switzerland) and the residue reattached in distilled water. Samples were maintained at 4 °C and protected from light.

## **2.4 Preparation of sausages and treatments**

The raw materials for production of 15 kg of sausage were lean pork (84%) and retail pork with 60% fat (16%), the ingredients were water (10%), salt (0,6%), condiments to tuscan sausage (1%), commercial mixture of healing, containing nitrate and sodium nitrite: 150 mg/kg (1%), crushed garlic (0,2%), ground white pepper (0,1%), dried marjoram (0,05%) and glutamate (0,05%), according to Terra (1998). After mixing the ingredients meat already prepared the mass was divided into five parts, which were added to the extracts and followed wallbox. In the control sample was not added extract. The remaining samples were mixed with 0,5% v/v (extract / sausage) hydro-ethanolic extract of yerba mate (YMA), purified extract of yerba mate (YMP), hydro-ethanolic extract of marcela (MA) and purified extract of marcela (MP). The samples were packed in plastic bags and stored at 4 °C for a period of 36 days. The tests were carried out as described below.

## **2.5 Physico-chemical analysis**

### **2.5.1 pH determination**

The pH of the sausage samples was measured after homogenization with distilled water at a 1:10 ratio using a digital pH meter (Digimed, DM 20, Brazil), as described by Terra & Brum (1988). Means of three measurements were recorded for each different sample. The pH of the sausage samples was recorded on days 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 and 36 of storage.

## 2.5.2 TBARS

The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) from lipid oxidation was determined by the method of Raharjo & Sofos (1993), 10g finely grinding the sample, add 40 ml of trichloroacetic acid (TCA- JT Baker- UK) 5%, mix and filter the mixture volumetric flask with funnel and Whatman No. 1 filter paper; pipetting 2 ml of volumetric flask in a tube and add 2 ml of thiobarbituric acid (TBA) 0,08 M, placed in boiling water bath for 5 min, read on spectrophotometer at a wavelength of 531nm, calibrating it with a white. The values of TBARS were determined in triplicate for each sample and were expressed as mg malonaldehyde (MDA) per kg sample and were recorded on days 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 and 36 of storage.

## 2.6 Microbiological analysis

### 2.6.1 Coliforms to 45°C/g

There was thermotolerant coliform counts of using the presumptive and confirmatory tests, aiming to control microbiological products (BRASIL, 2003). Tests were performed for each sample on days 0, 10, 20 and 30 storage.

### 2.6.2 *Staphylococcus* coagulase positive

Based on inoculation agar Baird-Parker, followed by proof and evidence coagulase were developed procedures for counting of *Staphylococcus* coagulase positive with results in CFU/g (BRASIL, 2003). Tests were performed for each sample on days 0, 10, 20 and 30 storage.



### 2.6.3 *Clostridium* Sulphite reducing to 46 °C

Inoculation and incubation in anaerobiosis, fermentation stormy and confirmatory tests are the procedures to be made for the counting of *Clostridium* Sulphite reducing (BRASIL, 2003). Tests were performed for each sample on days 0, 10, 20 and 30 storage.

### 2.6.4 *Salmonella* sp

Procedures for pre-enrichment, selective enrichment, isolation, selection and biochemical tests will be performed for detection of *Salmonella* sp. The results are expressed in absence or presence of *Salmonella* in 25 g (BRASIL, 2003). Tests were performed for each sample on days 0, 10, 20 and 30 storage.

### 2.6.5 Mesophilic aerobes

Sausages samples (25 g) were transferred into stomacher bags, diluted with 225 ml of Peptone water and stomached for 1 min in a Stomacher, resulting in a  $10^{-1}$  dilution used for analysis. Serial dilutions were prepared and 0,1 ml aliquots from each dilution were plated onto standard plate count agar (PCA). The plates were incubated at 37 °C for 48 h to determine mesophilic counts every 3 days during a period of 36 days of storage. Results were expressed as colony forming units (CFU)/g samples (BRASIL, 2003).

## **2.7 Sensory analysis**

Sensory tests were performed in the acceptance of products produced, using hedonic scale structured in 7 points, ranging from very disgust (note 1) to like very much (note 7). For evaluation of the samples will be used 50 non-trained tasters, evaluated the attributes of color, aroma, taste, texture and overall acceptability.

## **2.8 Statistical analysis**

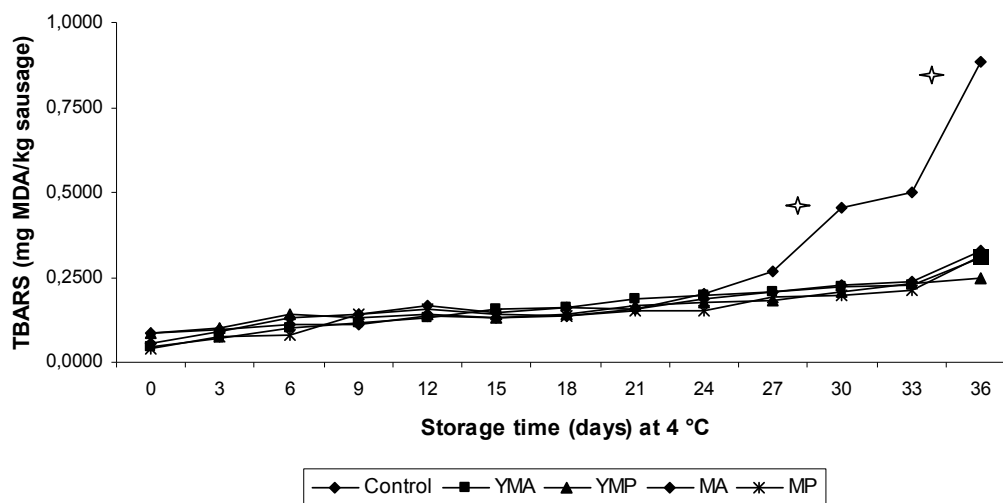
The physico-chemical tests were performed in triplicate and microbiological analysis in duplicate, data were evaluated by analysis of variance (ANOVA). Means were compared by Tukey test, considering the significance level of 5% ( $p < 0,05$ ) using the statistical package SAS 8.2 (SAS, 1996).

# **3 RESULTS AND DISCUSSION**

## **3.1 Lipid oxidation**

The TBARS test, despite its limitations, is the most usual in the assessment of meat products, due to its simplicity and speed (OSAWA, FELÍCIO & GONÇALVES, 2005). The changes in the values of TBARS were followed, every 03 days during the 36 days of storage (Figure 1). At 0 until 27 days of storage, all sausage samples showed levels of TBARS of at most 0,3302 mg MDA/Kg, without significant differences between them ( $p > 0,05$ ). Levels of TBARS at 30 days of the storage period were significantly higher

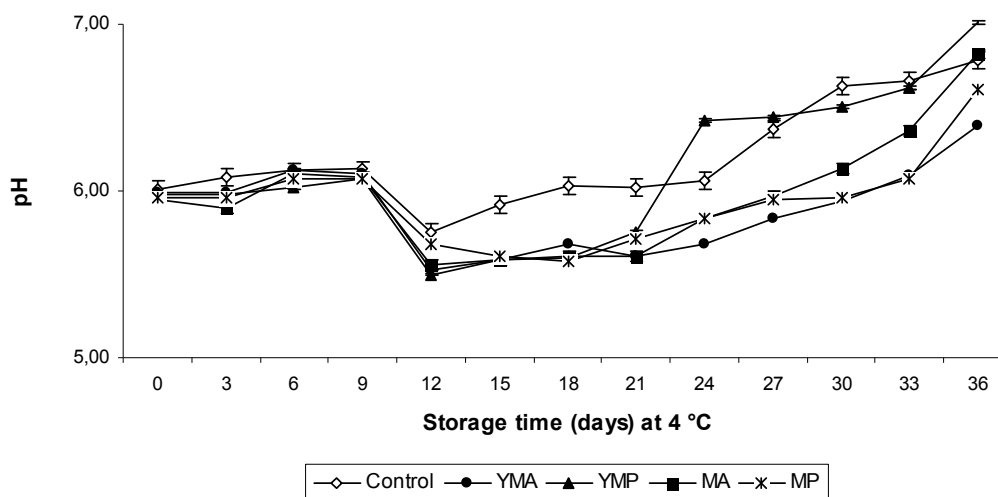
( $p < 0,05$ ) in sausages control than in YMA, YMP, MA and MP, and showed levels of at most 0,8840 mg MDA/Kg on 36 days. Jin *et al.* (2007) in a study evaluating the oxidative stability of pork sausage, reported values of TBARS with increasing levels of 0,900 mg MDA/kg up to 1,100 mg MDA/kg during the storage 0° C, over a period of 2 to 4 weeks, respectively. The YMP presented 0,2496 mg MDA/kg at 36 days, followed by YMA, with 0,3094, MP with 0,3302, and MA with 0,3146, without significant difference between these treatments ( $p > 0,05$ ) in this period, indicating as a result of this study, the oxidation stability of sausage containing hydro-ethanolic extracts and semi-purified extracts of *Achyrocline satureioides* (marcela) and *Ilex paraguariensis* (yerba mate) to 0,5% of meat products should be higher than control sausage without added extract.



**Figure 1-** Effect of storage time at 4 °C on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Means values of tuscan sausages with 0,5% extract. Control: no addition of extract; hydro-ethanolic extract of yerba mate (YMA), purified extract of yerba mate (YMP), hydro-ethanolic extract of marcela (MA) and purified extract of marcela (MP). ✦ Designates a significant difference from lipid oxidation ( $p < 0,05$ )

### 3.2 pH

The pH values (Figure 2) were similar between treatments on day 0 with 6,01, 5,99, 5,98, 5,95 and 5,96 in control, YMA, YMP, MA and MP, respectively, without significant differences between them ( $p>0,05$ ) and indicated that there was no interference of the extracts on this parameter in meat products. Remained stable until 9 days of storage in all treatments. From the 12 days there was a marked decrease, with values from 5,75, 5,53, 5,50, 5,56 and 5,68 in control, YMA, YMP, MA and MP, respectively. A decrease in the pH value was reported by Almeida (2005), noted that the pH value dropped from 5,88 to 5,68 after 10 days of storage at 4 °C in tuscan sausage wrapped in film permeable to oxygen. Their lower values indicate that some fermentation occurs during storage of these products, although no sugars are usually added to the sausage mixture. Following the behavior was increasing in all treatments. This is associated mostly with increase of Gram-negative bacteria populations (VERMA & SAHOO, 2000), such as Enterobacteriaceae and Pseudomonas, as well as yeasts and moulds, which cause protein and amino acid degradation resulting in formation of ammonia and consequent pH increase (NYCHAS, DROSINOS & BOARD, 1998). Similar behavior of pH values was described by Georgantelis *et al.* (2007) in a study with pork sausage stored at 4° C for 20 days. At day 36 of storage, the treatments had values of 6,78, 6,39, 7,01, 6,82 and 6,61 in control, YMA, YMP, MA and MP, respectively, macroscopic view showing the beginning of deterioration.



**Figure 2** - Values are means of pH for the storage of tuscan sausages with 0,5% extract. Control: no addition of extract; hydro-ethanolic extract of yerba mate (YMA), purified extract of yerba mate (YMP), hydro-ethanolic extract of marcela (MA) and purified extract of marcela (MP). (sd = vertical bar at each point)

### 3.3 Microbiological

Mesophilic aerobes, Coliforms to 45° C, *Clostridium* Sulphite reducing to 46° C, *Staphylococcus* positive coagulase and *Salmonella* sp were estimated to assess the general microbiological quality of the sausages since the microflora of the sausages could have implications for public health. The initial count of mesophilic aerobes found for the raw materials used in the formulation of  $10^6$  CFU. g<sup>-1</sup>, cited by Terra (1998) as acceptable range of microbiological contamination. This counting and commonly used to indicate the sanitary quality of foods (FRANCO & LANDGRAF, 1999), which, detects the number of aerobic bacteria or optional and mesophilic present both in the form vegetative and esporulated as in food. These results indicate that the raw material were properly handled in a hygienic ideals of accurate and kept showing good microbiological quality to be used with lipid safety in the preparation of products. During the storage of sausages suffered minor oscillations with a reduction of the counts of mesophilic aerobes on day 12 and

progressive increases, probably due to the behavior of pH, which, when reduced, may have inhibited growth, with damage to the metabolic microorganisms (LEISTNER, 2000). In the final period of storage, from 30 days, there was a process of bacterial growth in all samples, except in MA. That growth is probably due to the elimination of barriers such as pH and  $A_w$  that occurred during the cold storage. The increase in pH is related to the increase in heterotrophic bacteria, which reach higher levels to  $10^6$  CFU.  $g^{-1}$  showing proteolytic activity and lipolytic (TEODORO, ANDRADE & MANO, 2007). During the storage period studied, at 0, 10, 20 and 30 days under refrigeration at 4 °C, the count of *Clostridium* Sulphite reducing to 46° C was lower than  $1 \times 10^1$  CFU.  $g^{-1}$ , the *Staphylococcus* coagulase positive was lower than  $1 \times 10^2$  CFU.  $g^{-1}$ , Coliforms to 45° C was lower than  $1 \times 10^1$  CFU.  $g^{-1}$  and the *Salmonella* sp was absent in 25 g, those results showed no difference ( $p > 0,05$ ) among all treatments. According to the RDC 12 (BRASIL, 2001), approving Technical Regulation on microbiological standards for food, the tolerance in fresh pork sausage (raw sausages and the like) of *Clostridium* Sulphite reducing to 46° C is  $3 \times 10^3$  CFU.  $g^{-1}$ , of *Staphylococcus* coagulase positive is  $5 \times 10^3$  CFU.  $g^{-1}$ , of Coliforms to 45° C is  $5 \times 10^3$  CFU.  $g^{-1}$  and of *Salmonella* sp is absent in 25 g. Thus, one can see that the results presented in this study show that the sausage is considered within the limits allowed by Brazilian legislation, despite the occurrence of contamination indicate that even low in some stage before the time of analysis of the product. It is necessary to emphasize that the presence of pathogens in the raw material represents high risk to public health because they can remain viable in product ready for consumption. In the U.S., in a study of outbreaks of infections and food poisoning, it was found that the major cause, the temperature were improper storage of food (83%), cooking insufficient (67%), through cross-contamination of equipment and utensils during production (63%) and inadequate hygiene practices during the manufacturing (63%) D'Aoust (1997).

**Table 1-** Mesophilic aerobes (CFU. g<sup>-1</sup>) from tuscany sausages with different treatments.

Time (Days)	Treatments*				
	Control	YMA	YMP	MA	MP
0	1,3 × 10 <sup>5</sup> a,D	1,5 × 10 <sup>5</sup> a,B	1,3 × 10 <sup>5</sup> a,BC	1,4 × 10 <sup>5</sup> a,A	1,2 × 10 <sup>5</sup> a,D
3	5,0 × 10 <sup>5</sup> a,B	9,0 × 10 <sup>4</sup> b,B	9,0 × 10 <sup>4</sup> b,BC	3,0 × 10 <sup>4</sup> c,CD	8,0 × 10 <sup>4</sup> b,DEF
6	2,5 × 10 <sup>5</sup> a,C	9,0 × 10 <sup>4</sup> b,B	5,0 × 10 <sup>4</sup> c,BC	3,0 × 10 <sup>4</sup> c,CD	1,0 × 10 <sup>5</sup> b,DE
9	2,4 × 10 <sup>5</sup> a,C	1,0 × 10 <sup>5</sup> c,B	2,0 × 10 <sup>4</sup> d,C	2,0 × 10 <sup>4</sup> d,CD	2,0 × 10 <sup>5</sup> b,C
12	1,0 × 10 <sup>5</sup> a,DE	1,0 × 10 <sup>4</sup> b,B	1,0 × 10 <sup>4</sup> b,C	1,0 × 10 <sup>4</sup> b,D	1,0 × 10 <sup>4</sup> b,H
15	3,0 × 10 <sup>4</sup> b,E	2,6 × 10 <sup>4</sup> b,B	2,3 × 10 <sup>4</sup> b,BC	3,2 × 10 <sup>4</sup> b,CD	8,0 × 10 <sup>4</sup> a,DEF
18	1,9 × 10 <sup>4</sup> c,E	5,0 × 10 <sup>4</sup> a,B	2,0 × 10 <sup>4</sup> c,C	3,4 × 10 <sup>4</sup> b,C	4,7 × 10 <sup>4</sup> a,FGH
21	1,3 × 10 <sup>4</sup> c,E	2,0 × 10 <sup>4</sup> b,B	2,7 × 10 <sup>4</sup> a,BC	1,7 × 10 <sup>4</sup> bc,CD	2,0 × 10 <sup>4</sup> b,GH
24	1,8 × 10 <sup>4</sup> c,E	3,0 × 10 <sup>4</sup> b,B	3,0 × 10 <sup>4</sup> b,BC	2,0 × 10 <sup>4</sup> c,CD	4,5 × 10 <sup>4</sup> a,FGH
27	1,8 × 10 <sup>4</sup> e,E	4,0 × 10 <sup>4</sup> d,B	1,0 × 10 <sup>5</sup> a,BC	8,0 × 10 <sup>4</sup> b,B	6,0 × 10 <sup>4</sup> c,EFG
30	2,0 × 10 <sup>4</sup> d,E	5,0 × 10 <sup>4</sup> c,B	1,0 × 10 <sup>5</sup> a,BC	8,0 × 10 <sup>4</sup> b,B	9,0 × 10 <sup>4</sup> ab,DEF
33	2,4 × 10 <sup>5</sup> b,C	1,5 × 10 <sup>5</sup> c,B	3,5 × 10 <sup>5</sup> a,B	8,5 × 10 <sup>4</sup> d,B	3,4 × 10 <sup>5</sup> a,B
36	1,5 × 10 <sup>6</sup> a,A	1,6 × 10 <sup>6</sup> a,A	7,0 × 10 <sup>5</sup> b,A	9,0 × 10 <sup>4</sup> b,B	3,9 × 10 <sup>5</sup> b,A

a–d: Means in the same row with different letters are significantly different ( $p < 0,05$ ).

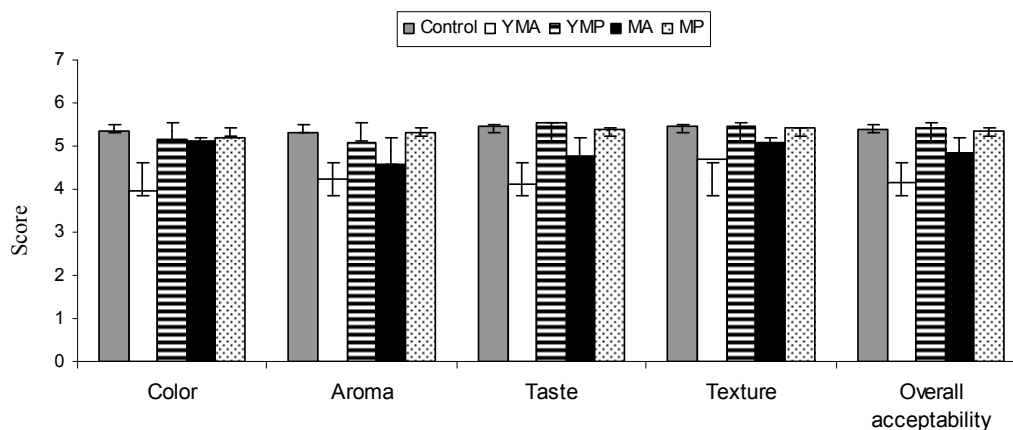
A-H: Means in the same column with different letters are significantly different ( $p < 0,05$ ).

\* Tuscany sausage added to 0,5% v/v (extract/sausage). Control: no addition of extract; hydro-ethanolic extract of yerba mate (YMA); purified extract of yerba mate (YMP); hydro-ethanolic extract of marcela (MA) and purified extract of marcela (MP)

### 3.4 Sensory

In the sensory analysis (Figure 3), parameters color and overall acceptability, the YMA had the lowest scores and significant difference ( $p < 0,05$ ) compared with YMP, MA, MP and control which does not differentiate among themselves. This result is due, possibly to slightly greenish color of sausages added to YMA. The thermal processing of green vegetables leads to changes in color, from green to milky green brown due to conversion of chlorophyll to feofitin, (FENNEMA, 2000), being transferred to the meat product added. Attribute in aroma, taste and texture the MP, YMP and the control showed higher levels of acceptance and no significant differences between them ( $p > 0,05$ ), the YMA had the lowest and not only differed significantly from MA. Souza (2006) working with potato peel extracts in chicken meat found that the purified extract did not interfere in the parameters

on the sensory control. The phenolic compounds involved in biochemical processes responsible for the formation of color, astringency, aroma and taste in foods of plant origin (SOARES, 2002) and may have interfered in the meat products of added hydro-ethanolic extracts in this study.



**Figure 3** - Average score of the hedonic scale, obtained by non-trained tasters in tuscan sausage with 0,5% extract. Control: no addition of extract; hydro-ethanolic extract of yerba mate (YMA), purified extract of yerba mate (YMP), hydro-ethanolic extract of marcela (MA) and purified extract of marcela (MP). (sd= vertical bar at each column)

## 4 CONCLUSION

The hydro-ethanolic extracts and purified to yerba mate and marcela were effective in reducing lipid oxidation of tuscan sausages during cold storage. The addition of 0,5% of hydro-ethanolic extract of mate interfered significantly in sensory evidence of acceptance of products, the other formulations did not interfere. Therefore, the addition of 0,5% of purified extract of yerba mate, the hydro-ethanolic extract of marcela or purified extract of marcela can be used in the preparation of tuscan sausages, providing safer products for consumers.



## REFERENCES

ALMEIDA, C. O. **Avaliação físico-química e microbiológica de lingüiça Toscana porcionada e armazenada em diferentes embalagens, sob condições de estocagem similares às praticadas em Supermercado.** 2005. Dissertação (mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Alimentos, 2005.

ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. **Food Chemistry**, v. 97, p. 459–464, 2006.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA-MATE. (1999). Atividade importante no Sul do País (pp. 53–55). Santa Cruz do Sul: Grupo de Comunicações Gazeta.

BAGGIO, S. R.; BRAGAGNOLO, N.; The effect of heat treatment on the cholesterol oxides, cholesterol, total lipid and fatty acid contents of processed meat products. **Food Chemistry**, v. 95, p. 611–619, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 12 de 02/01/2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2001.

CAMPAGNOL, P. C. B. **Cultura starter produzida em meio de cultura de plasma de suíno e antioxidante natural na elaboração do salame.** 2007. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

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

CHOI, J. M.; RYU, H. J.; CHUNG, J. H.; PARK, J. C.; HWANG, J. K.; SHIN, D. B., *et al.* Antioxidant property of genistein: inhibitory effect on HOCl induced protein degradation, DNA cleavage, and cell death. **Food Science and Biotechnology**, v. 14, p. 399–404, 2005.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v. 35, p. 13-21, 1990.

D'AOUST, J. Y. **Salmonelas e Salmoneloses de origem alimentar**, curso. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997. [Apostila].

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (“marcela”). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 9, p. 1163-1170, 1998.

DJERIDANE, A.; YOUS, M., NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 97, n.4, p. 654–660, 2006.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2. ed., Zaragoza: Editorial Acribia, 2000. 1258 p.

FERRARO, G. E.; NORBEDO, C.; COUSSIO, J. D.; Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 2053–2054, 1981.

FILIP, R.; FERRARO, G. E. Researching of new species of “Mate”: *Ilex brevicuspis*. Phytochemical and pharmacology study. **European Journal of Nutrition**, V. 42, P. 50–54, 2003.

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

FRANCO, B. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1999. 182p.

GEORGANTELIS, D.; AMBROSIADIS, I.; KATIKOU, P.; BLEKAS, G.; GEORGAKIS, S. A. Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. **Meat Science**, v. 76, p. 172–181, 2007.

JIN, I. S.; KIM, H. J.; JUNG, D. H.; KIM, Y. J.; CHOI, S. J.; HUR. The development of sausage including meat from spent laying hen surimi. **Poultry Science**, v. 86, n. 12, p. 2676-2684, 2007.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 550–557, 2006.

KIM, Y. C.; CHUNG, S. K. Reactive oxygen radical species scavenging effects of Korean medicinal plant leaves. **Food Science and Biotechnology**, v. 11, p. 407–411, 2002.

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

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p. 181–186, 2000.

MARTHA-ESTRELLA, G. P.; NIOKHOR, D. P.; STEVANOVIC, T.; Comparative study of antioxidant capacity of yellow birch twigs at ambient and high temperatures. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1. p. 344-351, 2007.

NYCHAS, G. J. E.; DROSINOS, E. H.; BOARD, R. G. Chemical changes in stored meat. In R. G. Board & A. R. Davies (Eds.), **The Microbiology of Meat and Poultry**. London: Blackie Academic and Professional, 1998. (pp. 288–326).

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: UFRGS. 6ª edição, 2007. 1104 p.

\_\_\_\_. **Investigação químico-farmacológica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (Marcela)**. 1984. 186 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Rio grande do Sul, Porto Alegre, 1984.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p. 71-81, 2002.

SOUZA, M. A. A. **Casca da batata inglesa (*Solanum tuberosum*) na proteção antioxidante da carne de frango**. 2006. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

PADILHA, A. D. G. **Antioxidante natural na conservação de carne de frango in vivo**. 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

RAHARJO, S; SOFOS, J. N. Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: A review. **Meat Science**, v. 35, n. 2, p. 145-169, 1993.

SAS. **Sas Institute Inc.** Cary, NC, 1996.

TEODORO, A. J.; ANDRADE, E. C. B.; MANO, S. B. Avaliação da utilização de embalagem em atmosfera modificada sobre a conservação de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*). **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 158-161, 2007.

TERRA, N. N. **Apontamentos sobre tecnologia de carnes**. São Leopoldo: UNISINOS, 1998. 216 p.

TERRA, N. N.; BRUM, M. A. R. **Carne e seus derivados, técnicas de controle de qualidade**. São Paulo: Ed. Nobel, 1988. 119 p.

VERMA, S. P.; SAHOO, J. Improvement in the quality of ground chevon during refrigerated storage by tocopherol acetate preblending. **Meat Science**, v. 56, n. 4, p. 403–413, 2000.

WONG, C.; LI, H.; CHENG, K.; CHEN, F. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. **Food Chemistry**, v. 97, n. 4, p. 705–711, 2006.

## 4 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram avaliados o efeito dos extratos hidro-etanólicos de erva mate a 0,5% (E0.5), de erva mate a 1% (E1), de marcela a 0,5% (M0.5), de marcela a 1% (M1), da composição mista de extratos de erva mate e de marcela (1/1, v/v) a 0,5% (EM0.5) e da composição mista de extratos de erva mate e de marcela (1/1, v/v) a 1% (EM1), na inibição da oxidação lipídica e na colorimetria de banha suína.

Como resultados da análise colorimétrica dos extratos adicionados em banha suína observou-se que na coordenada  $a^*$  os extratos hidro-etanólicos de erva mate e de marcela apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle/sem extrato e o E1 obteve o valor mais alto, diferenciando-se significativamente ( $p < 0,05$ ) dos demais, indicando uma maior interferência na cor, em direção ao vermelho, da banha suína. O M0.5 e o EM0.5, apresentaram os menores valores a partir do controle, respectivamente, demonstrando as menores interferências, neste parâmetro, sobre a banha suína. O E0.5, o M1 e o EM1 apresentaram valores intermediários e com interferência crescente, respectivamente, sobre o produto avaliado.

Na análise da coordenada colorimétrica  $b^*$  novamente os extratos hidro-etanólicos de erva mate e de marcela apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle/sem extrato, porém quando foram comparadas as concentrações, o E0.5 obteve o valor mais baixo a partir do controle, demonstrando a menor interferência neste parâmetro, sobre a banha suína. O E1 apresentou diferença ( $p < 0,05$ ) em relação a todos os tratamentos e indicou uma maior interferência na cor, em direção ao amarelo, do produto analisado. O M1 e o M0.5, bem como o EM1 e o EM0.5 apresentaram valores intermediários para este parâmetro. Segundo Fennema (2000), o processamento térmico de vegetais com folhas verdes modifica a cor, de verde para verde amarronzado, devido a conversão da clorofila em feofitina, sendo transferida ao produto adicionado.

Observou-se que quanto à coordenada  $L^*$ , o controle, o M0.5, o EM0.5 e o EM1 não demonstraram diferença significativa ( $p > 0,05$ ), indicando não

haver interferência, na luminosidade, da banha suína. Campagnol (2007), da mesma forma, não observou diferença significativa quanto à coordenada L\*, entre produtos cárneos adicionados ao extrato hidro-alcoólico de marcela e o controle, em salame. Os demais extratos e composições se diferenciaram do controle ( $p < 0,05$ ), interferindo neste parâmetro sobre a banha suína.

Na avaliação dos resultados da atividade antioxidante dos extratos hidro-etanólicos de marcela, de erva mate e das composições mistas de extratos (1/1, v/v), em relação a inibição da oxidação, acompanhada no teste de oxidação acelerada em banha suína, observou-se que a taxa de inibição da oxidação foi elevada para as diferentes formulações, porém não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre si. Foram encontrados valores entre 91,86 e 99,15% na inibição da oxidação lipídica, no teste de oxidação acelerada em banha suína.

Estes resultados estão de acordo com Anesini, Ferraro e Filip (2006); Bravo, Goya e Lecumberry (2007); Campos *et al.* (2007), que encontraram excelente atividade antioxidante no extrato de erva mate, e com Campagnol (2007) que encontrou, tal atividade da mesma forma para o extrato de marcela. Souza (2006) trabalhando com extrato hidro-etanólico bruto e purificado de casca de batata inglesa (*Solanum tuberosum*) encontrou valores entre 84% e 94% na inibição da oxidação lipídica em teste semelhante ao utilizado neste trabalho. Ainda, não foi constatado efeito sinérgico resultante da mistura de extratos de erva mate e marcela, já que não houve diferença significativa entre estes e os extratos puros sobre o percentual de inibição de oxidação. Da mesma forma, não houve antagonismo quanto ao efeito antioxidante na mistura de extratos.

Com base nos resultados acima expostos e discutidos, neste experimento também foi avaliado o efeito do extrato hidro-etanólico de erva mate (YMA), do extrato purificado de erva mate (YMP), do extrato hidro-etanólico de marcela (MA) e do extrato purificado de marcela (MP), adicionado (0,5%) em lingüiça toscana, com análise da estabilidade lipídica (TBARS), qualidade (pH e atributos sensoriais) e microbiologia (aeróbios mesófilos, coliformes a 45 °C/g, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Clostridium* sulfito redutores a 46 °C e *Salmonella* sp).

Do dia 0 até o dia 27 de armazenamento, todas as amostras apresentaram níveis de TBARS de no máximo 0,3302 mg MDA/kg, sem diferenças significativas entre si ( $p > 0,05$ ). Os níveis de TBARS em 30 dias de armazenagem foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) no controle do que em lingüiças YMA, YMP, MA e MP e apresentaram valores de no máximo 0,8840 mg MDA/kg aos 36 dias. De acordo com Torres e Okani (1997), estes níveis são considerados aceitáveis, haja vista que valores de até 1,59 mg de MDA/kg na carne não seriam percebidos por análise sensorial e também não causariam danos à saúde do consumidor. Jin *et al.* (2007) em um estudo avaliando a estabilidade oxidativa de lingüiça suína, relataram valores de TBARS com níveis de 0,900 mg MDA/kg até 1100 mg MDA/kg durante o armazenamento a 0° C, por um período de 2 a 4 semanas, respectivamente. O YMP apresentou 0,2496 mg MDA/kg em 36 dias, seguido por YMA, com 0,3094, MP com 0,3302 e MA com 0,3146, sem diferença significativa entre esses tratamentos ( $p > 0,05$ ) neste período, indicando a estabilidade oxidativa das lingüiças toscana contendo os extratos hidro-etanólicos e extratos purificados marcela e de erva mate, ambos a 0,5% dos produtos cárneos, sobre o controle/sem adição de extrato.

Nos valores de pH não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre todos os tratamentos no dia 0, com 6,01, 5,99, 5,98, 5,95 e 5,96 no controle, YMA, YMP, MA e MP, respectivamente e esses resultados indicaram que não houve interferência dos extratos sobre esse parâmetro nos produtos cárneos. O pH manteve-se estável até 9 dias de armazenamento em todos os tratamentos. A partir do 12° dia, houve uma queda acentuada, com valores de 5,75, 5,53, 5,50, 5,56 e 5,68 no controle, YMA, YMP, MA e MP, respectivamente. Uma diminuição no valor do pH foi relatado por Almeida (2005), que observou redução no pH de 5,88 para 5,68 em lingüiça toscana, após 10 dias de armazenamento a 4 °C, embalada em filme permeável ao oxigênio. Os valores menores indicam que uma fermentação ocorreu durante o armazenamento desses produtos, embora geralmente, açúcares não são adicionados à mistura das lingüiças, porém acredita-se ter sido ocasionada pela glicose contida na cura rápida. Na sequência, o comportamento do pH foi crescente em todos os tratamentos e isto está associado, essencialmente, ao aumento da população de bactérias gram-negativas (VERMA e SAHOO,

2000), como *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*, bem como bolores e leveduras que causam degradação de proteínas e aminoácidos, resultando na formação de amônia e conseqüente aumento pH (NYCHAS, DROSINOS e BOARD, 1998). Comportamento similar nos valores de pH foi descrito por Georgantelis *et al.* (2007) em um estudo com lingüiça suína, armazenada a 4 ° C, onde houve um decréscimo nos valores do pH até o 5º dia de armazenamento e depois sucessivos aumentos até o 20º dia.

No 36º dia de armazenamento, os tratamentos apresentaram valores de pH de 6,78, 6,39, 7,01, 6,82 e 6,61 no controle, YMA, YMP, MA e MP, respectivamente, mostrando a visualização macroscópica de início de deterioração.

Foi realizada a contagem de aeróbios mesófilos, coliformes a 45 °C, *Clostridium* sulfito redutores a 46 °C, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* sp para avaliar a qualidade microbiológica das lingüiças, uma vez que a contaminação da microflora poderia gerar implicações para a saúde pública. A primeira contagem de aeróbios encontrados para as matérias-primas utilizadas na formulação das amostras para todos os tratamentos foi inferior a 10<sup>6</sup> UFC .g<sup>-1</sup>, citada por Terra (1998) como faixa aceitável de contaminação microbiana. Esta contagem é comumente utilizada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos (FRANCO e LANDGRAF, 1999) e detecta o número de bactérias aeróbicas ou facultativas mesófilas, que se apresentam tanto sob a forma vegetativa como esporulada na alimentação. Estes resultados indicam que as matérias-primas foram devidamente tratadas em condições de higiene ideais e foram bem conservadas, mostrando boa qualidade microbiológica para ser usada com segurança na preparação dos produtos. Durante o armazenamento as lingüiças sofreram ligeiras oscilações, com uma redução na contagem de aeróbios no 12º dia e progressivo aumento, provavelmente devido ao comportamento do pH, que, quando reduzido, pode ter inibido o crescimento, com prejuízos para o metabolismo dos microrganismos (LEISTNER, 2000). No último período de armazenagem, a partir de 30 dias, houve um processo de crescimento bacteriano em todas as amostras, exceto em MA. Esse crescimento é, provavelmente, devido à eliminação de obstáculos, tais como pH e atividade de água (Aw) que ocorreram durante o armazenamento refrigerado. O aumento do pH está



relacionado com o aumento de bactérias heterotróficas, que atingem níveis superiores a  $10^6$  UFC.  $g^{-1}$ , mostrando atividade proteolítica e lipolítica (TEODORO, ANDRADE e MANO, 2007).

Durante o período de armazenamento estudado, em 0, 10, 20 e 30 dias sob refrigeração a 4 °C, a contagem de *Clostridium* sulfito redutores a 46 °C foi menor que  $1 \times 10^1$  UFC.  $g^{-1}$ , o *Staphylococcus* coagulase positiva foi menor que  $1 \times 10^2$  UFC.  $g^{-1}$ , coliformes a 45 °C foi menor que  $1 \times 10^1$  UFC.  $g^{-1}$  e *Salmonella* sp foi ausente em 25 g, esses resultados não demonstraram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre todos os tratamentos. Segundo a RDC 12 (BRASIL, 2001), que aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, a tolerância em embutidos frescos para *Clostridium* sulfito redutores a 46 °C é  $3 \times 10^3$  UFC.  $g^{-1}$ , de *Staphylococcus* coagulase positiva é  $5 \times 10^3$  UFC.  $g^{-1}$ , de coliformes a 45 °C é  $5 \times 10^3$  UFC.  $g^{-1}$  e de *Salmonella* sp é ausência em 25 g. Assim, pode-se notar que os resultados apresentados neste estudo mostram que as lingüiças foram consideradas dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira. É necessário enfatizar que a presença de patógenos na matéria-prima representa alto risco para a saúde pública, porque estes podem permanecer viáveis no produto pronto para consumo. Nos E.U.A., segundo D'Aoust (1997), em um estudo em surtos de infecções e intoxicações alimentares, verificou-se que as principais causas foram a temperatura inadequada de armazenamento dos alimentos (83%), o cozimento insuficiente (67%), a contaminação cruzada através dos equipamentos e utensílios durante o processo de produção (63%) e as práticas inadequadas de higiene durante a fabricação (63%).

Na análise sensorial, nos parâmetros cor e aceitação global, o YMA obteve a menor pontuação e com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação com YMP, MA, MP e controle, que não se diferenciam entre si. Este resultado se deve, possivelmente, a cor ligeiramente esverdeada de lingüiças adicionadas de YMA. O processamento térmico de vegetais verdes leva a mudança na cor, do verde ao verde amarronzado devido à conversão de clorofila para feofitina, (FENNEMA, 2000), sendo transferida para o produto cárneo adicionado. Nos atributos de aroma, sabor e textura o MP, o YMP e o controle, apresentaram os maiores níveis de aceitação e não houve diferença significativa entre estes ( $p > 0,05$ ), o YMA apresentou o menor valor e diferiu

significativamente do MA ( $p < 0,05$ ). Souza (2006), trabalhando com extratos de cascas de batata adicionados em cortes de frango, concluiu que o extrato purificado não interferiu nos parâmetros sensoriais sobre o controle. Os compostos fenólicos envolvidos em processos bioquímicos são os responsáveis pela formação de cor, adstringência, aroma e sabor em alimentos de origem vegetal (SOARES, 2002) e podem ter interferido nos produtos cárneos adicionados dos extratos hidro-etanólicos, neste estudo.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

Os extratos hidro-etanólicos de erva mate, de marcela e as composições mistas de extratos (1/1:v/v), ambos a 0,5% e 1% em banha suína, apresentaram elevada atividade antioxidante e não foi observado efeito sinérgico, nem antagônico, na composição mista de extratos (1/1:v/v) de erva mate e marcela sobre a inibição da oxidação lipídica.

Os extratos de erva mate, de marcela e as composições mistas de extratos (0,5% e 1%), na análise da colorimetria das coordenadas  $a^*$  e  $b^*$ , apresentaram interferência em relação ao controle-sem extrato, sendo que o extrato de erva mate a 1% obteve o mais alto valor, indicando uma maior interferência na cor da banha suína. Quanto à coordenada  $L^*$ , o controle, as composições mistas de extratos e o extrato de marcela a 0,5% não indicaram interferência, na luminosidade, da banha suína.

Os extratos hidro-etanólicos e purificados de erva mate e de marcela foram eficazes na redução da oxidação lipídica de lingüiças toscana, durante o armazenamento refrigerado e não interferiram nos outros parâmetros físico-químicos e microbiológicos. A adição de 0,5% do extrato hidro-etanólico de erva mate interferiu significativamente na prova de aceitação sensorial dos produtos, já as outras formulações não interferiram e podem ser utilizadas na preparação de lingüiças toscana, fornecendo produtos mais seguros para os consumidores.

Estudos futuros devem ser realizados no sentido de se alcançar uma purificação mais eficaz dos extratos, mantendo sua atividade antioxidante, mas sem interferir nos atributos sensoriais dos produtos e buscando um produto comercial para utilização na agroindústria, ou mesmo, na indústria de produtos cárneos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiologia de los Alimentos**. España, Acribia, 464 p., 1997.

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

AHH, D. U. *et al.* Effects of dietary vitamin E supplementation on lipid oxidation and volatiles content f irradiated cooked turkey meat patties with different packaging. **Poultry Science**. v. 77, p. 912-920, 1998.

ALMEIDA, C. O. **Avaliação físico-química e microbiológica de lingüiça toscana porcionada e armazenada em diferentes embalagens, sob condições de estocagem similares às praticadas em supermercado**. 2005. 127 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, p. 121–144, 1987.

AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative disease. **Science**. v. 221, p. 1256-1263, 1983.

ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. **Food Chemistry**, v. 97, p. 459–464, 2006.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA-MATE. (1999). Atividade importante no Sul do País (pp. 53–55). Santa Cruz do Sul: Grupo de Comunicações Gazeta.

ARAUJO, M. A. J. **Química dos alimentos** -Teoria e prática. 2.ed. - Viçosa: UFV, 416p. 1999.

ARREDONDO, M. F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MORQUIO, A., FERREIRA, M., ABIN-CARRIQUIRY, J. A., LAFON, L.; DAJAS, F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main

flavonoids against oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 91, n. 1, p. 13-20, 2004.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001. 144p.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R. A.; KLEINJANS, J. **Food Chem. Toxicol.** v. 38, n. 599, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.

\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 12 de 02/01/2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2001.

\_\_\_\_. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 4, de 31/03/2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, e de Lingüiça e de Salsicha. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: Brasília, 05 abr. 2000, Seção I, p. 6-10.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate, **Food Research International**, v. 40, p. 393–405, 2007.

CAMPAGNOL, P. C. B. Cultura starter produzida em meio de cultura de plasma de suíno e antioxidante natural na elaboração do salame. 2007. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

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

CANTERLE, L. P. **Erva mate e atividade antioxidante**. 2005. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

CAO, Y. H.; CAO, R. H. Angiogenesis inhibited by drinking tea. **Nature**, v. 398, n. 381, p. 6726, 1999.

CECHINEL, F. V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. **Química nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHOI, J. M.; RYU, H. J.; CHUNG, J. H.; PARK, J. C.; HWANG, J. K.; SHIN, D. B. Antioxidant property of genistein: inhibitory effect on HOCl induced protein degradation, DNA cleavage, and cell death. **Food Science and Biotechnology**, v. 14, p. 399–404, 2005.

CHU, Y.; HSU, H. Effects of antioxidants on peanut oil stability. **Food Chemistry**, v. 66, p. 29–34, 1999.

COMBS, G. F. The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health. 2 ed. New York: Academic Press, p. 246-275, 1998.

COULTATE, T. P. Food: the chemistry of its components. Cambridge: **The Royal Society of Chemistry**, n. 4, p. 73–125, 2002.

CRUCES-BLANCO, C.; CARRETERO, A. S.; BOYLE, E. M.; GUTIÉRREZ, A. F. **Talanta**, n. 50, p. 1099, 1999.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (“marcela”). **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n.9, p. 1163-1170, 1998.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: Old and New Aspects of a Class of Natural Therapeutic Drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337–353, 1999.

DJERIDANE, A.; YOUS., M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 97, n. 4, p. 654–660, 2006.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2. ed., Zaragoza: Editorial Acribia, 2000. 1258 p.

FERRARO, G. E.; NORBEDO, C.; COUSSIO, J. D.; Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 2053–2054, 1981.

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

FILIP, R.; SEBASTIAN, T.; FERRARO, G.; ANESINI, C. Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 4, p. 649–655, 2007.

FRANCO, B. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1999. 182p.

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

GEORGANTELIS, D.; AMBROSIADIS, I.; KATIKOU, P.; BLEKAS, G.; GEORGAKIS, S. A. Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. **Meat Science**, v. 76, p. 172–181, 2007.

GORDON, M. H. The mechanism of antioxidant action in vitro. In B. J. F. Hudson, **Food Antioxidants**, p. 1–18, 1990.

GRAY, J. I.; GOMMA, E. A.; BUCKLEY, D. J. Oxidative quality and shelf life of meats. **Meat Science**, v. 43, p. 111–123, 1996.

HALLIWEL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 33–50, 1996.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals and biology and medicine**. 3 ed. Clarendon, Oxford, 2000.

HAMILTON, R. J.; KALU, C.; PRISK, E.; PADLEY, F. B.; PIERCE, H. Chemistry of free radicals in lipids. **Food Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 193–199, 1997.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481–504, 2000.

HAYOUNI, E. A.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, M.; HAMDY, M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1126-1134, 2007.

HORAX R. *et al.* **Effect of gamma irradiation and storage time on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in chicken breast meat infused with antioxidants and select plant extracts**. The Food Safety Consortium Annual Meeting, Manhattan, Oct 13-15, 1999.

HUDSON, B. J. F. **Food Antioxidants**. London, New York: Elsevier Applied Science. p. 169-78, 1990.

IBRAC - Indústria Brasileira de Aditivos e Condimentos. **Teoria e Prática na Industrialização de Carnes**. Departamento Técnico - IBRAC. Rio Claro, 1980. [manual teórico-prático].

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 4, p. 433-446, 2001.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; HASEGAWA, A.; SHIBATA, M.; OGISO, T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F 344 rats. **Journal of The National Cancer Institute**, v. 70, p. 343-347, 1983.

JIN, I. S.; KIM, H. J.; JUNG, D. H.; KIM, Y. J.; CHOI, S. J.; HUR. The development of sausage including meat from spent laying hen surimi. **Poultry Science**, v. 86, n. 12, p. 2676-2684, 2007.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J. P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 3954-3962, 1999.

KAHL, R.; HILDEBRANDT, A. G. Methodology for studying antioxidant activity and mechanisms of action of antioxidants. **Food Chemical Toxicology**, v. 24, n. 10/11, p. 1007- 1014, 1986.

KARPINSKA M.; BOROWSKI J.; DANOWSKA-OZIEWICZ M. The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. **Food Chemistry**, v. 72, n. 1, p. 5-9, 2001.



KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 550–557, 2006.

KIM, Y. C.; CHUNG, S. K. Reactive oxygen radical species scavenging effects of Korean medicinal plant leaves. **Food Science and Biotechnology**, v. 11, p. 407–411, 2002.

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

KOBA, K.; MATSOUKA, A.; OSADA, K.; HUANG, Y. Effect of loquat (*Eriobotrya japonica*) extracts on LDL oxidation. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 308-316, 2007.

KRING, U.; BERGER, R. G. Antioxidant activity of some roasted foods. **Food Chemistry**, v. 72, p. 223-229, 2001.

KUBOW, S. Toxicity of dietary lipid peroxidation products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 1, p. 67–71, 1990.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p. 181–186, 2000.

LEONG, L. P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**, v. 76, n. 1, p. 69-75, 2002.

LYON, B. G.; LYON, C. E.; ANG, C. Y. W.; YOUNG, L. L. Sensory analysis and thiobarbituric acid values of precooked chicken patties stored up to three days and reheated by two methods. **Poultry Science**, v. 67, p. 736-742, 1988.

LODOVICI, M.; GUGLIELMI, F.; CASALINI, C.; MEONI, C. *et al.* Antioxidant and radical scavenging properties in vitro of polyphenolic extracts from red wine. **European Journal of Nutrition**, v. 40, p. 74–77, 2001.

MADHAVI, D. L.; SALUNKHE, D. K. **Em Antioxidants**; Maga, J.; Tu, A. T., eds.; Marcel Dekker: New York, 1995, 89 p.

MADSEN, H. L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 271–277, 1995.

MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1258-1268, 2007.

MARTHA-ESTRELLA, G. P.; NIOKHOR, D. P.; STEVANOVIC, T.; Comparative study of antioxidant capacity of yellow birch twigs at ambient and high temperatures. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 344-351, 2007.

MEHTA, R. L.; ZAYAS, J. F.; YANG, S. S. Ajowan as a source of natural lipid antioxidant. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 1420-1422, 1994.

MIYAGUSKU, L.; THOMAZINI, M.; KUAYE, A. Y.; CASTILLO, C. J. C. Avaliação do valor de TBARS em coxas de frangos irradiadas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 45-49, 2007.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H. *et al.* Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 45–171, 2001.

NAWAR, W. W. Lipids. *In*: O. R. Fennema, O.R. (Ed.). **Food chemistry**, v. 2. New York: Marcel Dekker, 1985. p. 139-244.

NEWBURG, D. S.; CONCON, J. M. Malonaldehyde concentrations in food are affected by cooking conditions. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 6, p. 1681–1687, 1980.

NYCHAS, G. J. E.; DROSINOS, E. H.; BOARD, R. G. Chemical changes in stored meat. *In* R. G. Board & A. R. Davies (Eds.), **The Microbiology of Meat and Poultry**. London: Blackie Academic and Professional, 1998. (pp. 288–326).

ODA, S. H. I. *et al.* Segurança e qualidade para os embutidos. **Revista Nacional da Carne**, n.º 317, julho 2003. Disponível em: <http://www.dipemar.com.br/carne/307/index/htm>. Acesso em: 15 jan. 2009.

OHSHIMA, H.; YOSHIE, Y.; AURIOL, S.; GILIBERT, I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide,

peroxynitrite and nitroxyl anion. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, n. 9, p. 1057–1065, 1998.

OLIVO, R. **Alterações oxidativas em produtos cárneos**. Globalfood Sistemas, Ingredientes e tecnologia para Alimentos Ltda, p. 9, 2005.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de tba aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

PANIANGVAIT, P.; KING, A. J.; JONES, A. D.; GERMAN, B. G. Cholesterol oxides in foods of animal origin. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1159– 1174, 1995.

PELEG, H.; BODINE, K. K.; NOBLE, A. C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, v. 23, n. 3, p. 371-378, 1998.

PRÄNDL, O.; FISCHER, A.; SCHMIDHOFER, T. SINELL, H. J. Tecnología y higiene de la carne. Zaragoza: Ed. Acribia, 1994. 854 p.

PRATT, D. E. Natural antioxidants from plant material. In: HUANG, M. T.; HO, C. T.; LEE, C. Y (Org.). **Phenolic compounds in food and their effects on health**. Washington: American Chemical Society, 1992. p. 54-71.

RAHARJO, S; SOFOS, J. N. Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: A review. **Meat Science**, v. 35, n. 2, p. 145-169, 1993.

RHEE, K. S. Chemistry of meat flavor. In: MIN, D. B.; SMOUSE, T. H. (Org.). **Flavor chemistry of lipid foods**. Champaign: AOCS, 1989. 462 p.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, P. G.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Res.**, v. 22, n. 4, p. 375-383, 1995.

ROMERO, N.; ROBERT, P.; MASSON, L.; ORTIZ, J.; GONZÁLEZ, K. *et al.* Effect of  $\alpha$ -tocopherol,  $\alpha$ -tocotrienol and Rosa mosqueta shell extract on the performance of antioxidant-stripped canola oil (*Brassica* sp.) at high temperature. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 383–389, 2007.

SÁNCHEZ-ESCALANTE, A.; DJENANE, D.; TORRESCANO, G.; BELTRÁN, J. A.; RONCÁLES, P. The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. **Meat Science**. v. 58, p. 421-429, 2001.

SAS. **Sas Institute Inc.** Cary, NC, 1996.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 32, n.1, p.67-103, 1992.

SIMÕES, C. M. O. **Investigação químico-farmacológica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (Marcela)**. 1984. 186 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Rio grande do Sul, Porto Alegre, 1984.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (LAM.) D.C. Compositae. **J. Ethnopharmacol**, v. 22, p. 281–293, 1988.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p. 71-81, 2002.

SOUZA, M. A. A. **Casca da batata inglesa (*Solanum tuberosum*) na proteção antioxidante da carne de frango**. 2006. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

STAUFFER, C. E. **Fats and oils**. Minnesota. USA: Eagan Press. 1996. 14 p.

TAPIERO, H.; TEW, K. D.; NGUYEN BA, G.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomedecine & Pharmacotherapy**, v.56, n.4, p. 200-207, 2002.

TEODORO, A. J.; ANDRADE, E. C. B.; MANO, S. B. Avaliação da utilização de embalagem em atmosfera modificada sobre a conservação de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*). **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 158-161, 2007.

TERRA, N. N. **Apontamentos sobre tecnologia de carnes**. São Leopoldo: UNISINOS, 1998. 216 p.

TERRA, N. N.; BRUM, M. A. R. **Carne e seus derivados, técnicas de controle de qualidade**. São Paulo: Ed. Nobel, 1988. 119 p.

TORRES, E. B. **Alta Presión Isostática**: estudio del color y de la fracción lipídica de productos avícolas. 2003. 154 f. Tese. (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Facultat Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2003.

TORRES, E. A. F. S.; OKANI, E. T. Teste de TBA: Ranço em alimentos. **Revista Nacional de Carne**, n. 243, p. 68-76, 1997.

VERHAGEN, H. *et al.* Disposition of single oral doses of butylated hydroxytoluene in man and rat. **Food Chemical and Toxicology**, v. 27, n. 12, p. 756-772, 1989.

VERMA, S. P.; SAHOO, J. Improvement in the quality of ground chevon during refrigerated storage by tocopherol acetate preblending. **Meat Science**, v. 56, n. 4, p. 403–413, 2000.

VOGEL, A. **Química analítica qualitativa**. 5 ed. São Paulo: Editora Mestre Jou. 1981, 665 p.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chemistry**, v. 63, p. 335–342, 1998.

WITCHI, H. P. Enhanced tumor development by butylated hidroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastro-intestinal tract. **Food Chemical Toxicology**, v. 24, n. 10/11, p. 1127-1130, 1986.

WHYSNER, J.; WANG, C. X.; ZANG, E.; IATROPOULOS, M. J.; WILLIAMS, G. M. Dose response of promotion by butylated hydroxyanisole in chemically initiated tumours of the rat fore stomach. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, p. 215–222, 1994.

WONG, C.; LI, H.; CHENG, K.; CHEN, F. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. **Food Chemistry**, v. 97, n. 4, p.705–711, 2006.

XU, B. J.; CHANG, S. K. C. Sensory & Nutritive Qualities of Food: A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. 159-166, 2007.

YAMAMOTO, N.; MOON, J.; TSUSHIDA, T.; NAGAO, A.; TERAO, J. Inhibitory Effect of Quercetin Metabolites and Their Related Derivatives on Copper Ion-Induced Lipid Peroxidacion in Human Low-density Lipoproteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 372, n. 2, p. 347-354, 1999.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, p. 5165-5170, 2001.