

**URI - CAMPUS ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*  
St. Hil) EM SALAME TIPO ITALIANO**

PATRÍCIA BEAL

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

**ERECHIM, RS - Brasil**  
**OUTUBRO DE 2010.**

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*  
St. HIL) EM SALAME TIPO ITALIANO**

PATRÍCIA BEAL

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

Prof. Dr. Rogério Luis Cansian  
Orientador

---

Prof. Dr. Eunice Valduga  
Orientador

---

Prof. Dr. Neusa Fernandes de Moura  
FURG

---

Prof. Dr. Clarissa Dalla Rosa  
URI

Erechim, Outubro de 2010.

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

Dedico este trabalho:

À minha família: meus pais Antonio e Ivete, à minha querida mana Aline, pela motivação inicial e constante, me fazendo acreditar que ter um objetivo é o passo mais importante para se cumprir uma tarefa.

E ao amor da minha vida, meu namorado Gilmar, por fazer tudo em minha vida valer a pena, e estar sempre ao meu lado me apoiando.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por mais esta conquista.

A meus pais Antonio e Ivete pelo carinho, amor e por serem meu exemplo de vida. A minha irmã Aline, que mesmo distante estava sempre ao meu lado me apoiando e me incentivando.

Ao meu namorado, Gilmar por todo seu amor incondicional, pelo apoio e por estar sempre do meu lado.

A colega e amiga, Andréia pelos tantos momentos que passamos juntas, nas risadas, até mesmos nas horas mais difíceis, mas o importante que estávamos sempre juntas, dando uma força a outra, e agora podemos comemorar mais uma de muitas conquistas que estão por vir em nossas vidas.

Ao meus tão queridos tios, Airton e Ivanete pela amizade e pelo carinho, o qual me acolheram em sua casa, me proporcionando fazer parte de sua família. E aos meus amados primos Rodrigo e Rafael pelo carinho.

E não poderia esquecer dos meus amigos, Elza e Dorvalino, onde tanto se preocupavam comigo, pois todos os dias me acolhiam em sua casa para almoçar.

Ao meu orientador Rogério Luis Cansian e minha orientadora Eunice Valduga pela paciência, amizade e conhecimento transmitido.

Aos professores Alexandre José Cichoski e Alice Tereza Valduga pela ajuda inicial prestada.

A todos os professores do programa de pós-graduação da Engenharia de Alimentos da URI.

Ao pessoal da Central de Matérias pelo apoio técnico para realização dos experimentos.

À URI – Campus de Erechim pelo apoio na realização deste projeto.

Agradeço a todos enfim, que mesmo quando não perceberam, com palavras gestos e atitudes, incentivaram esta pesquisa.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

## **INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. HIL) EM SALAME TIPO ITALIANO**

Patrícia Beal

Outubro/2010

Orientadores: Rogério Luis Cansian  
Eunice Valduga

Um dos maiores desafios para a indústria de carne é atender às exigências de um mercado consumidor cada vez mais rigoroso, que avalia, além da qualidade do produto, fatores como variedade, valor nutricional e características sensoriais. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi empregar extrato de erva-mate como antioxidante natural na elaboração de salame tipo Italiano, com o propósito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais têm sido restringidos por causa do seu potencial de toxicidade. Foram avaliadas a evolução das características físico-químicas (pH,  $a_w$ , acidez, índices de cor, umidade, nitrito, oxidação de lipídios e proteína), microbiológicas (bactérias lácticas e Micrococcaceae) e sensoriais (sabor) das formulações de salame tipo Italiano tradicional (controle), adicionada de 0,3 e 0,4 % (p/p) de extrato de erva-mate e com 0,2 % (p/p) de antioxidante artificial, durante 60 dias de armazenamento. A atividade antioxidante *in vitro* do extrato de erva-mate aumenta proporcionalmente a concentração de extrato adicionado atingindo 95,67 % de atividade antioxidante para a concentração 500 µg/mL e a correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de extrato utilizado forneceu um IC<sub>50</sub> de 157,85 µg/mL. As formulações de salame - tipo Italiano resultaram num produto com valores de pH entre 4,72 e 5,01 e atividade de água entre 0,752 a 0,790. De acordo com o regulamento técnico de

identidade de qualidade do salame tipo italiano, as formulações estariam dentro do permitido que é no máximo 35 % de umidade, no período de 60 dias. O crescimento das bactérias lácticas foi mais expressivo no 2º dia de maturação (8,22 a 8,50  $\log_{10}$  UFC/g ) apresentando no final da maturação valores entre 5,15 a 5,56  $\log_{10}$  UFC/g. As concentrações testadas do extrato de erva-mate não inibiram os micro-organismos pertencentes a este grupo, não afetando assim o processo fermentativo do produto. Os menores índices de cor objetiva a\* (vermelho) foram verificados aos 60 dias na formulação controle e na com 0,4 % de extrato de erva-mate, de 12,27 e 12,23. Os valores de luminosidade demonstram que a adição de extrato de erva-mate não interferiram no brilho do produto. Em relação aos atributos sabor e textura, a aceitabilidade nas formulações com extrato de erva-mate foi semelhante ao do salame que continha antioxidante artificial, o que indica que não houve interferência do extrato de erva-mate nas características globais do produto. Durante o armazenamento todas as formulações apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos teores de TBARS quando comparadas ao tratamento controle (sem adição de antioxidante), comprovando a ação antioxidante da presença de 0,4 % extrato da erva-mate no produto. Na formulação com adição de 0,4 % de extrato de erva-mate e na com antioxidante artificial (eritorbato de sódio) ocorreu redução da concentração de carbonil. Indicando assim que nesta concentração o extrato de erva-mate pode ter exercido ação antioxidante frente à oxidação de proteínas.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

**INFLUENCE OF YERBA MATE (*Ilex paraguariensis* St. HIL) ADDITION IN THE ITALIAN TYPE SALAMI**

PATRÍCIA BEAL

October/2010

Advisors: Rogério Luis Cansian  
Eunice Valduga

A major challenge for the meat industry is to meet the demands of a consumer market increasingly stringent, which assesses, and a quality product, factors such as variety, nutritional value and sensory characteristics. In this sense, the objective was to employ yerba mate extract as a natural antioxidant in the preparation of Italian salami with the aim of replacing synthetic antioxidants, which have been restricted because of its potential toxicity. We evaluated the evolution of physical and chemical characteristics (pH, aw, acidity, color indices, moisture, nitrite, lipid and protein oxidation), microbiological (lactic acid bacteria and Micrococcaceae) and sensory (flavor) of the formulations of Italian salami traditional (control), added 0.3 and 0.4% (p / p) of extract of yerba mate and with 0.2% (p / p) of artificial antioxidant, during 60 days of storage. The in vitro antioxidant activity of extract of yerba mate increases in proportion to added concentration reaching 95.67% of antioxidant activity for the concentration 500 mg mL<sup>-1</sup> and the correlation between antioxidant activity (%) and the concentration of extract used provided an IC<sub>50</sub> of 157.85 g mL<sup>-1</sup>. The formulations of salami - Italian type resulted in a product with pH values between 4.72 and 5.01 and a water activity between 0.752 to 0.790. In accordance with the technical regulation of identity of the quality of the Italian type salami, the formularizations would be inside of the allowed one that it is in humidity maximum 35%, in the period of 60 days.

The growth of lactic acid bacteria was more significant on the 2<sup>nd</sup> day of maturation (between 8.22 and 8.50 log<sub>10</sub> UFC / g) presenting the final maturation values between 5.15 to 5.56 log<sub>10</sub> UFC / g. The concentrations of the extract of mate did not inhibit micro-organisms belonging to this group, thus not affecting the fermentation product. The lowest rates of objective color a\* (red) were observed for 60 days in the control formulation and 0,4% of extract of yerba mate, from 12,27 and 12,23. In relation to the attributes flavor and texture, acceptability in the formulations with yerba mate extract was similar to the salami with artificial antioxidant, what it indicates that did not have interference of the extract in the global characteristics of the product. During the storage all the formulations had presented significant difference ( $p < 0,05$ ) in TBARS content when compared with the control treatment (without antioxidant), proving the antioxidant action of the 0.4% of yerba mate extract in the product. In the formulation with addition of 0.4% of yerba mate extract and in the one with artificial antioxidant substance (sodium eritorbate) it occurred reduction of the carbonil concentration. Indicating as soon as in this concentration the yerba mate extract can have exerted antioxidant action in relation to the protein oxidation.

## SUMÁRIO

Resumo	vi
Abstract	viii
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xv
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Aspectos do processamento de Salames	17
2.1.1 Características dos ingredientes	18
2.1.2 Principais operações do processamento	24
2.2 Alterações em produtos cárneos	25
2.2.1 Oxidação Lipídica	25
2.2.2 Oxidação de Proteínas	26
2.3 Antioxidantes	27
2.3.1 Antioxidantes Naturais	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Coleta e preparo das amostras de erva-mate	32
3.2 Obtenção do extrato de erva-mate	33
3.3 Atividade antioxidante do extrato em pó	36
3.4 Elaboração das formulações de Salame	37
3.5 Maturação e armazenamento do Salame	38
3.6 Determinações físico-químicas das formulações	39
3.6.1 Umidade	39
3.6.2 Atividade de água (aw)	40
3.6.3 pH	40
3.6.4 Acidez total	40
3.6.5 Oxidação de lipídios	40
3.6.6 Oxidação de proteínas	41
3.6.7 Cor objetiva	41
3.6. 8 Nitrito	41

3.7 Análises Microbiológicas	42
3.7.1 Contagem de Bactérias Lácticas	42
3.7.2 Contagem de Bactérias da Família Micrococcaceae	43
3.8 Análise sensorial	43
3.9 Análise estatística	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato de erva-mate	45
4.2. Características físicas das formulações de salame – Tipo Italiano	47
4.2.1 Aspectos visuais	47
4.2.2. Cor objetiva	49
4.3. Características físico-químicas das formulações de salame – Tipo Italiano	55
4.3.1 Umidade e atividade de água	55
4.3.2 pH e acidez	61
4.3.3 Oxidação dos Lipídeos (TBARS) e proteínas	66
4.3.4 Nitrito	72
4.4. Avaliação microbiológica das formulações de salame – Tipo Italiano	72
4.4.1. Bactérias Lácticas	72
4.4.2 Micrococcaceae	76
4.5 Características organolépticas das formulações de salame – Tipo Italiano	79
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	83
5.1 Conclusões	83
5.2 Sugestões para trabalhos futuros	84
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO	100
APÊNDICE	101

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Aspectos das folhas de erva-mate após exposição de 30 minutos ao sol (a) e submetidas à operação de "rolagem e torção" das folhas (b), respectivamente. ....	32
Figura 2 - Aspectos das folhas de erva-mate: (a) pré-maceradas, (b) Após 6 horas em câmara á 4°C, (c) Dessecas em estufa a 30°C, respectivamente. ....	33
Figura 3 - Extrator de solúveis por percolação de solvente.....	34
Figura 4 - Vista Frontal do secador por atomização.....	35
Figura 5 - Aspecto do extrato em pó de erva-mate: a - Folhas de erva-mate dessecadas em estufa e triturada; b - Extrato em pó obtido dos solúveis da erva-mate após secagem em <i>spray dryer</i> , respectivamente. ....	35
Figura 6 - Material utilizado para avaliação sensorial dos Salames Tipo Italiano..	43
Figura 7- Modelo da Ficha de avaliação sensorial para o teste de Escala Hedônica. ....	44
Figura 8 – Aspecto visual da massa das formulações de salame (a - controle; b - 0,3% de extrato de erva-mate; c - 0,4 % de extrato de erva-mate; d - antioxidante artificial) logo após o processamento, salame maturado por 7, 14 e 21, 60 dias, respectivamente. ....	48
Figura 9 – Gráfico de dispersão com os valores da Luminosidade (L*) das formulações – Tipo Salame, durante o armazenamento em condições controladas em câmara de maturação e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados em temperatura ambiente. ....	50
Figura 10 - Gráfico de dispersão com os valores do índice de cor vermelha (a*) em formulações de salame - Tipo italiano, durante o armazenamento em condições controladas em câmara de maturação e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados em temperatura ambiente. ....	52
Figura 11 - - Gráfico de dispersão com os valores médios do índice de cor amarela (b*) em formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento em condições controladas em câmara de maturação e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados em temperatura ambiente. ....	54

Figura 12 - Gráfico de dispersão com os valores de $a_w$ em formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento em condições controladas na câmara de maturação e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados na temperatura ambiente. ....	57
Figura 13 - Gráfico de dispersão com os valores de umidade das formulações de salame - Tipo Italiano, durante o período de 21 dias de armazenamento em câmara de maturação e após embalados à vácuo. ....	60
Figura 14 - Gráfico de dispersão com os valores de pH das formulações de salame - Tipo Italiano, durante o período de 21 dias de armazenamento em câmara de maturação e após embalados à vácuo. ....	63
Figura 15 - Gráfico de dispersão com os valores médios da acidez Total em formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento em condições controladas na câmara de maturação e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados na temperatura ambiente. ....	66
Figura 16 - Perfil cinético da concentração de TBARS nos salames processados durante o período de armazenamento. ....	69
Figura 17 - Evolução da oxidação das proteínas medida pelo índice de carbonil do salame tipo italiano durante o período de 21 dias de processamento e após 60 dias de estocagem a temperatura de 22 °C. ....	71
Figura 18 - Gráfico de dispersão com o acompanhamento da contagem das bactérias lácticas em formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento em condições controladas na câmara de maturação e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados na temperatura ambiente. ....	75
Figura 19 - Gráfico de dispersão com o acompanhamento da contagem das bactérias Micrococcaceae em formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento em condições controlada em câmara de maturação e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados em temperatura ambiente. ....	78
Figura 20 - Histograma de frequência para Aceitação geral aos 21 (a) e 60 dias (b), respectivamente (9 - gostei muitíssimo, 8 - gostei muito, 7 - gostei moderadamente, 6 - gostei ligeiramente, 5 - não gostei / nem desgostei, 4 - desgostei ligeiramente, 3 - desgostei moderadamente, 2 - desgostei muito, 1 - desgostei muitíssimo).....	81

Figura 21 - Ficha de especificação do COMBISTART 1505 .....	100
Figura 22 - Curva de calibração da atividade antioxidante do extrato de erva-mate óleo essencial de manjerição ( <i>Ilex paraguariensis</i> ).....	101

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações das formulações de salame testadas. ....	37
Tabela 2 - Condições operacionais da câmara de armazenamento. ....	39
Tabela 3 - Atividade antioxidante (AA) do extrato de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ).....	46
Tabela 4 - Luminosidade (L*) das formulações de salame - Tipo Italiano durante o armazenamento. ....	49
Tabela 5 - Índice de cor vermelha (a*) das formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento.. ....	51
Tabela 6 - Índice de cor amarela (b*) das formulações de salame -Tipo Italiano, durante o armazenamento. ....	53
Tabela 7 - Atividade de água (a <sub>w</sub> ) das formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento. ....	56
Tabela 8 - Teores de umidade em formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento. ....	59
Tabela 9 - Valores de pH em formulações em Salame - Tipo Italiano durante o armazenamento. ....	61
Tabela 10 - Acidez total das formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento. ....	65
Tabela 11 - Oxidação de lipídios (TBARS) em formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento.....	67
Tabela 12 - Oxidação de proteínas em formulações de salame - Tipo Italiano durante o armazenamento. ....	70
Tabela 13 - Bactérias Lácticas (log <sub>10</sub> UFC/g) em formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento.....	73
Tabela 14 - Contagem de bactérias pertencentes à família Micrococcaceae em formulações de salame - Tipo Italiano durante o armazenamento.....	77
Tabela 15 - Características sensoriais das formulações de salame – Tipo Italiano durante o armazenamento. ....	80

## 1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da sociedade nas últimas décadas, e as mudanças de hábitos alimentares e ambientais, estabeleceu-se uma nova relação da população com os alimentos. Neste contexto, os consumidores procuram nos alimentos, uma vida mais saudável e um meio de evitar doenças.

Um dos maiores desafios para a indústria de carne é atender às exigências de um mercado consumidor cada vez mais exigente, que avalia, além da qualidade do produto, fatores como diversidade, valor nutricional, características sensoriais, entre outros, mantendo preços acessíveis a fim de tornar seus produtos competitivos nas prateleiras dos supermercados.

A produção de salames no Brasil compõe uma fatia significativa do mercado de produtos cárneos. Mudanças na busca de melhor qualidade, redução de custos e investimentos na tecnologia de produção, foram percebidas pelo mercado consumidor brasileiro, que é responsável pela produção de 110 a 120 toneladas/dia de salames (TERRA, 2005). Muito embora a tecnologia de processamento na indústria de carnes tenha avançado significativamente nos últimos anos, aperfeiçoando métodos de preservação e armazenamento de produtos cárneos, a vida de prateleira destes produtos sofre limitações significativas em função das transformações bioquímicas e microbiológicas que ocorrem nos mesmos, destacando-se, entretanto, a oxidação lipídica como uma das causas mais importantes de deterioração de processamento e estocagem (SUMMO et al., 2006). A oxidação lipídica, pode ser retardada pela utilização de antioxidantes, dos quais os sintéticos (BHT - butilhidroxitolueno, BHA - butilhidroxianisol e TBHQ - butilhidroquinona terciária). O emprego destes compostos tem sido questionado quanto a sua inocuidade, motivando a busca por antioxidantes naturais que possam atuar isolados ou sinergicamente com outros aditivos, para substituir parcial e totalmente os sintéticos (MELO et al., 2003). A aplicação de antioxidantes em alimentos gordurosos é extremamente importante na proteção de seus constituintes insaturados, principalmente os óleos e gorduras, de modo a evitar sabores e odores indesejáveis e, deste modo, manter

de maneira efetiva a palatabilidade, aceitabilidade e o valor nutricional dos mesmos (POURCHET-CAMPOS, 1996).

Em recentes pesquisas tem-se verificado a capacidade antioxidante da erva-mate *in vitro* e *in vivo* equivalente ou superior à vitamina C, vitamina E e/ou Trolox, substâncias consideradas como padrão para essa propriedade. GUGLIUCCI & STAHL (1995) verificaram que extratos aquosos e alcoólicos de *Ilex paraguariensis* inibiram a oxidação da lipoproteína de baixa densidade *in vitro*, comparável ao ácido ascórbico. Propriedades antioxidantes de extratos aquosos de erva-mate *in vivo* foram confirmadas através da inibição da peroxidação lipídica em microssomas de fígado de ratos (SCHINELLA et al., 2000). CANTERLE (2005), verificaram que a erva-mate na forma de chimarrão possui uma importante quantidade de compostos capazes de aumentarem o sistema de defesa antioxidante de um organismo sendo sua ingestão uma maneira eficaz e econômica de se usufruir seus benefícios. SALDANHA (2005) verificaram elevada atividade antioxidante em diferentes extratos de erva-mate (verde e tostada) e de chá verde, indicando o potencial uso dessas plantas como antioxidantes alimentícios. Mais recentemente, o extrato de erva-mate foi investigado quanto à atividade antioxidante em produtos alimentícios tais como iogurte (PRECI, 2010) e carne de frango (PADILHA, 2007).

Com o intuito de aumentar a qualidade dos embutidos cárneos, este trabalho teve como objetivo utilizar o extrato de erva-mate como possível antioxidante natural na fabricação de salame tipo Italiano, com o propósito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais têm sido restringidos por causa do seu potencial de toxicidade. Com esse objetivo, acompanhou-se a evolução das características físico-químicas (pH,  $a_w$ , acidez, índices de cor, umidade, nitrito, oxidação de lipídios e proteínas), microbiológicas (bactérias lácticas e Micrococcaceae) e sensoriais (sabor) das formulações de salame tipo Italiano tradicional (controle), adicionadas de 0,3 e 0,4 % (p/p) de extrato de erva-mate e com 0,2 % (p/p) de antioxidante artificial, durante 60 dias de armazenamento.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Neste item, são apresentados aspectos do processamento de salames, legislação brasileira em vigor, fatores que afetam a maturação, emprego de antioxidantes sintéticos e naturais, bem como as algumas alterações que ocorrem em produtos cárneos (oxidação de lipídeos e proteínas, etc).

### **2.1 Aspectos do processamento de Salames**

Os produtos cárneos representam uma parte importante da dieta humana. Apesar da grande variedade de salames existente, esses produtos podem ser definidos como produtos cárneos elaborados pela mistura de carne picada (moída), pedaços de gordura, sal, agentes de cura, açúcar e temperos, embutidos em envoltório e submetido à fermentação e posteriormente secagem (DALLA SANTA, 2008). A fabricação do salame se dá em duas fases: na primeira, há a fermentação com a ocorrência simultânea de acidificação e formação da cor; a segunda fase consiste na desidratação como decorrência da fermentação. Ao final deste período, o salame tipo Italiano deverá apresentar pH de 5,2 a 5,4 e atividade de água de 0,87, caracterizando o final do processo. Ambas as fases acima ocorrem em câmara de maturação dotada de controle de temperatura e umidade relativa (TERRA, 2005).

Segundo GARCIA & GAGLEAZZI (2000), a fermentação é considerada como a etapa mais importante do processamento do salame. É nesta etapa que ocorrem à maioria das transformações físicas, bioquímicas e microbiológicas, que são influenciadas pelas características da matéria-prima e do processo presente, nas propriedades organolépticas do produto final. LIZASCO et al. (1999) resumiram as transformações decorrentes nas seguintes etapas: alteração na microflora inicial, decréscimo nos valores de pH, redução do nitrato a nitrito para a formação da mioglobina nitrosa, solubilização e geleificação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, proteólise, lipólise e fenômenos oxidativos, além da desidratação.

Os embutidos fermentados podem ser classificados em secos e semi-secos. A formulação em carnes, tamanho das partículas, intensidade do sabor, tipo da tripa utilizada e tempo de conservação são variáveis que contribuem para a existência de uma ampla variedade de embutidos secos e semi-secos. Os embutidos semi-secos diferem dos secos por possuírem sabor mais picante, textura mais branda e menos rugosa, contendo aproximadamente 50 % de água enquanto que os secos possuem 35 % de umidade permanecendo em maturação por 10 a 100 dias (CAMPAGNOL, 2007).

A fermentação pode ser natural ou iniciada com a adição de culturas, conhecidas como *starters* (GALLI, 1993). O uso de *starters* na fabricação de salame contribui para a redução do tempo de fabricação, confere melhor cor, aroma e sabor ao produto final, reduz a contaminação microbiológica com conseqüente aumento da vida útil do produto, e possibilita a redução de formação de nitrosaminas durante o processamento (TERRA, 1990). Em geral, todas as classes de micro-organismos são usadas na fermentação de alimentos, porém as bactérias e as leveduras são mais utilizadas que os bolores. Entre as bactérias, o grupo das ácido-lácticas são as mais importantes. Estes micro-organismos causam a rápida acidificação da matéria-prima, pela produção de ácidos orgânicos. Sendo assim, a atividade metabólica das bactérias lácticas aumenta à vida de prateleira e a segurança alimentar, melhora a textura e contribui na formação do perfil sensorial do produto final (DALLA SANTA, 2008).

### **2.1.1 Características dos ingredientes**

O processo de fabricação de embutidos fermentados consiste em um complexo fenômeno biológico provocado por micro-organismos desejáveis que atuam sinergicamente. O início da produção de salames ocorre por meio do uso de matérias-primas e aditivos de boa qualidade, instalações e equipamentos adequados que são imprescindíveis à qualidade do produto final.

Normalmente, as carnes utilizadas na elaboração de embutidos fermentados são provenientes de suínos e bovinos. Não é fácil padronizar a composição química da carne, já que existem muitas diferenças devido a fatores

como a espécie, a raça, o sexo, a idade, o tipo de alimentação e o corte analisado. Os componentes majoritários da carne são a água (65 a 80 %), proteínas (16 a 22 %), gordura (3 a 13 %) (DALLA SANTA, 2008).

As características finais peculiares dos salames dependem também do tipo e qualidade da carne utilizada. Cabe ressaltar que as condições de transporte e o manejo antes do abate, podem interferir na qualidade da carne e conseqüentemente, nas características finais do produto (TERRA & BRUM, 1998).

A gordura utilizada deve ser da região dorsal, cuja proporção entre ácidos graxos saturados e insaturados permite o seu estado sólido em temperatura ambiente. Para salames com vida de prateleira elevada, não mais do que 12 % do total de ácidos graxos podem ser poliinsaturados, caso contrário rancidez, defeitos no sabor e aroma irão se desenvolver rapidamente (CAMPAGNOL et al., 2007).

As características da gordura utilizada são fundamentais para a qualidade final do produto, pois contribuem significativamente para o estabelecimento da estrutura e características organolépticas do salame. A rancificação das gorduras leva a formação de compostos que produzem alterações no *flavour* do produto, conferindo sabor típico de ranço e escurecimento dos salames (DALLA SANTA, 2008). Além disso, a qualidade microbiológica final dos salames é fortemente influenciada pelas condições microbiológicas do toucinho, já que este não sofre ação significativa da fermentação (DEGENHARDT, 2006).

A adição de cloreto de sódio contribui para a diminuição da  $A_w$  e também provoca modificações na pressão osmótica, que juntamente com a ação tóxica do íon cloro dificulta o desenvolvimento de determinados grupos de microorganismos. A capacidade do sal para solubilizar as proteínas miofibrilares é de fundamental importância para desenvolver com sucesso um produto curado. Essas proteínas solubilizadas servem como uma capa para ligar as partículas de gordura e água, resultando em uma emulsão estável (PRICE & SCHWEIGERT, 1994). BERNARDI et al. (2008) citam que inicialmente o cloreto de sódio desempenha um papel muito importante em produtos cárneos, uma vez que auxilia no *flavour*, textura e vida de prateleira. Qualquer alteração no teor de sal

de embutidos cárneos requer a reformulação dos ingredientes, já que dificilmente pode-se eliminá-lo totalmente em razão de suas propriedades funcionais.

Os açúcares contribuem para melhorar o aroma da carne curada e servem de substrato para a produção de ácidos pelos micro-organismos presentes na carne ou pelas culturas adicionadas (CAMPAGNOL et al., 2007). A variedade e a quantidade de carboidratos adicionados são importantes, pois determinam a velocidade da multiplicação das bactérias lácticas, já que quanto maior o peso molecular, menor será a velocidade da fermentação. A presença de açúcar cria condições redutoras durante o processo de cura, o que previne o desenvolvimento de aromas de oxidação. O ambiente redutor formado influi na cor da carne curada porque estabiliza o  $Fe^{2+}$  (DEGENHARDT, 2006).

Os sais de cura, como nitrato e nitrito de sódio e/ou potássio, são largamente utilizados como aditivos alimentares no processamento de produtos cárneos. Os sais de nitrito, além de conservarem a carne contra a deterioração bacteriana, são fixadores de cor e agentes de cura. Seus efeitos adversos são representados principalmente pela metamioglobina tóxica e pela formação de nitrosaminas. Seu uso é discutível dada a possibilidade de originar compostos nitrosos de ação carcinogênica (OLIVEIRA et al., 2005).

O nitrito age como um outro obstáculo contra o crescimento de micro-organismos patogênicos que possam estar presentes na matéria-prima, principalmente contra o *Clostridium botulinum* (GIRARD, 1991). Ele pode ser adicionado diretamente ou pode ser obtido através da redução do nitrato, promovida pela ação de bactérias redutoras. A cor rósea é obtida devido à formação do pigmento nitrosilmioglobina com o óxido nítrico proveniente da redução de nitrito (FARIA & YOTSUYANAGI, 2002). Entretanto, a adição excessiva de nitrito pode causar escurecimento da carne, promovendo a oxidação da mioglobina, que leva à formação da metamioglobina, substância que ocasiona o esverdeamento do produto (AGUIAR et al., 2006).

A redução dos nitratos é realizada pelas bactérias da família Micrococcaceae, durante as primeiras 24 horas, quando os níveis de ácido láctico ainda não estão elevados. Essas bactérias possuem um sistema nitrato e nitrito redutase que favorece a ocorrência das reações de cura responsáveis pela

coloração típica destes produtos cárneos. Esta atividade bacteriana é favorecida pelas temperaturas relativamente baixas e altas concentrações iniciais de cloreto de sódio. As Micrococcaceae vão desaparecendo, pouco a pouco, devido à microaerofilia e baixo pH (TERRA et al., 2001). Temperaturas de fermentação elevadas aceleram a acidificação, o que pode causar a inibição do desenvolvimento das Micrococcaceae, impedindo a redução eficaz do nitrato a nitrito, deixando os embutidos com cor indesejada, e ainda, proporcionar sabor e aroma fortes ao produto. Por outro lado, se a umidade relativa estiver muito baixa, poderá ocorrer uma desidratação excessiva e se formar uma crosta superficial no embutido, o que impedirá a eliminação de água do interior do produto, favorecendo o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis (BACUS, 1984; LÜCKE, 1998).

Segundo BRASIL (2000), a legislação brasileira vigente prevê limites máximos de 0,015g/100g (150 ppm) e 0,03g/100g (300 ppm) respectivamente, para nitrito e nitrato de sódio para carnes e produtos cárneos, denominando estes produtos como conservantes. A concentração necessária para ocorrência dos diversos efeitos quando de seu emprego em produtos cárneos varia entre 30 e 50 ppm para o desenvolvimento de cor, entre 20 e 40 ppm para desenvolvimento de aroma, entre 80 e 150 ppm para o efeito conservante (TERRA et al., 2006).

Tradicionalmente, na elaboração de salames são adicionados diversos condimentos, com o objetivo de conferir sabor e odor peculiares ao produto. A utilização de condimentos permite a obtenção de produtos com características particulares.

As culturas *starters* são adicionadas a produtos cárneos para assegurar melhor confiabilidade ao produto em termos de saúde pública, com menor tempo de fermentação, e para obter um produto final de qualidade, com textura, aroma e sabor constante e aumentar a vida de prateleira. Inicialmente, a fermentação era o resultado da ação dos micro-organismos resultantes das contaminações sobre os açúcares existentes na formulação com produção de ácido láctico. A qualidade dos salames não era uniforme, pois dependia da "house flora". A partir de 1961, culturas puras de micro-organismos úteis passaram a ser disponíveis,

possibilitando dessa forma, a obtenção de salames com alta qualidade (BIASI et al., 2007).

Segundo BUCKENHÜSKES (1993), vários critérios específicos devem ser considerados para seleção de culturas *starters* na aplicação em alimentos, dentre os quais estão às características da matéria-prima, a tecnologia a ser aplicada para a produção, à atividade metabólica e as características desejadas no produto final. Dessa forma, as características fisiológicas e bioquímicas dos micro-organismos, além de serem utilizadas para caracterizar as espécies, também são usadas como ferramenta para selecionar e classificar grupos de micro-organismos com potencial para uso industrial (DALLA SANTA, 2008).

Os *starters* com micro-organismos do gênero *Staphylococcus* coagulase negativa melhoram a cor e o *flavor* dos produtos. Por isso, a combinação destas culturas iniciadoras resultará num produto de alta qualidade em um menor tempo de processamento. Deste modo, para se obter um produto com qualidade, apresentando boas características em relação à cor e ao sabor e a garantia dos padrões microbiológicos, é necessário que as culturas *starters* sejam adicionadas a fim de competir com os micro-organismos presentes na carne (BIASI, 2007).

Durante a elaboração de embutidos fermentados, os micro-organismos desempenham papel decisivo. Sendo que a função das bactérias lácticas na fermentação de carnes é a rápida produção de ácido láctico, o que provoca a redução do pH inibindo a ação de micro-organismos patogênicos e aumentando a vida de prateleira do produto processado. Outras funções destas bactérias são as produções de *flavour* diferenciado e a desnaturação das proteínas (BUCKENHUSKES, 1993; CARIONI et al., 2001). A redução do nitrato, o decréscimo do pH, a formação do aroma, a estabilidade da cor e a capacidade de conservação, são características ou processos que se desenvolvem durante a maturação e que são significativamente influenciados pelos micro-organismos presentes. Quando se empregam combinações de espécies microbianas redutoras de nitrato e acidificadoras, pode-se trabalhar com cloreto de sódio e nitrato de potássio. Como os micro-organismos da cultura *starter* são capazes de desdobrar rapidamente os carboidratos, pode ser necessário diminuir a quantidade de açúcar adicionado, pois agregando doses excessivas, pode haver

acidificação inicial muito intensa, o que acarreta defeitos na consistência e sabor dos embutidos (VIEIRA & MENDONÇA, 2005).

O desenvolvimento do sabor e aroma em produtos cárneos está relacionado principalmente com os compostos oriundos da oxidação dos lipídeos, da ação das enzimas endógenas e das enzimas microbianas. Essas enzimas estão envolvidas nos processos metabólicos como a glicólise, proteólise e lipólise. Pode-se modular o aroma com o uso de diferentes espécies de *Staphylococcus* coagulase negativas. Fatores tecnológicos, envolvendo temperatura, umidade relativa, natureza e diâmetro da peça cárnea, etc, influenciam significativamente (CICHOSKI et al., 2004).

Micrococcaceae são os micro-organismos mais importantes utilizados como culturas *starters* no processamento de embutido fermentado seco. As bactérias da família Micrococcaceae participam na preservação de produtos cárneos, evitando a rancidez e desenvolvimento da típica cor vermelha, devido à catálise e nitrito redutase. São mais frequentemente utilizadas como cultura *starter* comercial no processamento de embutidos, juntamente com *Staphylococcus xylosum* e *Staphylococcus carnosus*. A associação do *Staphylococcus carnosus* juntamente com o *Lactobacillus pentosus* na fabricação de embutidos tem importante papel na lipólise por sintetizar aromas essenciais para a qualidade organoléptica do produto e proporcionar o efeito de baixar rapidamente o pH pela transformação do açúcar em ácido láctico. Sua catálise destrói os peróxidos responsáveis por sabor ranço. O *Staphylococcus carnosus* também possui atividade nitrato redutora, é homofermentativo, anaeróbio facultativo, tolera concentrações de até 16 % de cloreto de sódio em água. A temperatura de crescimento ótima é 30°C, a máxima 45°C e a mínima 10°C. É bastante utilizado quando se necessita uma coloração mais intensa nos produtos fermentados (MARTÍN et al., 2007).

A aplicação do fungo *Penicillium nalgiovense* na superfície do salame colabora na formação do *flavor* pela formação de compostos voláteis através de um conjunto de enzimas tais como desaminases, transaminases e desidrogenases. Salienta-se o fato de que a deposição externa regula não somente a entrada do ar (rancificação) como da luz, potente catalisador da

rancificação do tocinho. Uma perfeita cobertura de fungos sobre a superfície do salame auxilia numa perda de umidade mais homogênea, de forma lenta e progressiva, atuando na diminuição de formação de crosta na superfície dos embutidos (TERRA, 2005).

### **2.1.2 Principais operações do processamento**

A matéria-prima pode ser moída em *cutters* ou moedores, de acordo com a granulometria desejada. Durante essa etapa deve-se trabalhar com o tocinho (-7°C) e as carnes congeladas (-1°C). A moagem do tocinho com temperatura elevada faz com que parte da gordura se emulsione, causando a formação de uma pseudo-emulsão que irá se colocar entre a massa e a tripa, dificultando a desidratação e desqualificando a aparência do salame. Após a moagem, a matéria-prima é misturada com os demais ingredientes e é embutida em tripas (naturais ou artificiais) de diâmetro variável. Durante o embutimento, é muito importante retirar o oxigênio da massa cárnea, já que este interfere no desenvolvimento da cor e do sabor do produto final (CAMPAGNOL et al., 2007).

Após o embutimento, o produto é levado à câmara de maturação, onde se controla a temperatura e a umidade relativa, sendo estes, dois parâmetros importantes para se obter uma fermentação adequada. Na etapa da fermentação, as bactérias lácticas metabolizam os carboidratos presentes na massa gerando ácido láctico, ocasionando uma diminuição do pH. O decréscimo de pH, além de causar a coagulação das proteínas miofibrilares, estabilizando a emulsão cárnea, produz rápida inibição de bactérias gram-negativas presentes na massa; por outro lado, quando o pH diminui, alcança-se o ponto isoelétrico das proteínas, diminuindo sua capacidade de retenção de água (CAMPAGNOL et al., 2007).

Durante a etapa de maturação, desenvolve-se a textura do produto por meio da perda de peso, que varia entre 30 e 40 %, e ocorrem numerosas reações enzimáticas catalisadas tanto por enzimas tissulares como microbianas, originando substâncias que contribuem para o sabor e aroma do produto final (CAMPAGNOL et al., 2007).

## **2.2 Alterações em produtos cárneos**

Das alterações mais importantes em carne e produtos cárneos e que ocasionam grandes problemas durante o armazenamento, destacam-se as reações de oxidação de lipídios e proteínas, os quais afetam sensorialmente os produtos e muitas vezes comprometendo sua aceitação pelo consumidor, como também são responsáveis pelo surgimento de compostos tóxicos associados a problemas de saúde.

### **2.2.1 Oxidação Lipídica**

A oxidação lipídica, conduz a descoloração, perda de valor nutricional e é o principal fator de rejeição dos produtos oxidados, desenvolvimento dos sabores rançosos. A rancidez dos alimentos não afeta apenas sensorialmente os produtos, como é também responsável pelo surgimento de compostos tóxicos associados a problemas de saúde, como as doenças circulatórias, o câncer e o envelhecimento. As reações oxidativas são favorecidas por fatores como a temperatura e a luz, porém, nos produtos cárneos, além destes promotores, a rancidez é estimulada por íons ferro presentes nas moléculas de mioglobina, proteínas que no animal vivo possuem a função de transportar o oxigênio e que são as responsáveis pela coloração das carnes vermelhas (GARCIA et al., 2002).

Algumas etapas no processamento como moer, triturar, dentre outras, aceleram as reações de oxidação em embutidos pela introdução do oxigênio molecular e por promover o contato dos catalisadores com os lipídeos presentes no tecido (MENDES, 1999). A rancidez oxidativa é uma reação do oxigênio atmosférico com as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados. A reação produz peróxidos e hidroperóxidos. Estes compostos, por uma série de reações paralelas produzem os compostos voláteis, aldeídos e cetonas que dão o odor ranço no alimento (MORETTO & FETT, 1998).

Neste contexto, a oxidação lipídica em carnes pode ser acompanhada através do valor de TBARS (TARLADGIS et al., 1960), visto que produtos

primários de oxidação lipídica constituem-se principalmente de hidroperóxidos, os quais são rapidamente decompostos em várias substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), particularmente carbonilas, sendo o malonaldeído o elemento mais importante.

A formação de malonaldeído ocorre através da decomposição de hidroperóxidos, produtos primários da oxidação lipídica. Alguns dos fatores que determinam a extensão na formação deste aldeído através de ácidos graxos poliinsaturados são: o grau de insaturação, a presença de metais, o pH, a temperatura, a duração e condições de aquecimento (ROTTA, 2007).

A susceptibilidade da carne à oxidação lipídica tem sido estudada por diversos pesquisadores com a finalidade de buscar soluções para amenizar este problema. Com isto, estão sendo aplicadas diferentes tecnologias de processamento e armazenamento para aumentar o tempo de vida útil destes produtos, como embalagens a vácuo ou com atmosfera modificada, as quais se têm mostrado efetivas no retardo da oxidação (GRAY et al., 1996; GRAU et al., 2000).

### **2.2.2 Oxidação de Proteínas**

O efeito mais significativo da oxidação de proteínas são mudanças nas propriedades reológicas de um alimento. Algumas alterações oxidativas em proteínas e aminoácidos que resultam no desenvolvimento de *off-flavours* estão resumidas como a oxidação de histidina, cisteína, metionina, triptofano, tirosina, peróxido de hidrogênio, podem ocorrer quando o alimento contendo fotossensibilizadores, como a riboflavina quando exposta à luz (AaRDT, 2003).

Embora as proteínas também sejam substratos para ação dos radicais livres, seu efeito sobre elas é menos intenso do que se verifica nos lipídeos, devido ao fato das reações serem mais lentas. Devido ao dano oxidativo, as proteínas podem sofrer modificações em aminoácidos específicos, mudanças conformacionais, fragmentação da cadeia peptídica ou alteração da carga elétrica. Estas alterações podem provocar diversas conseqüências funcionais, tais como aumento da susceptibilidade à proteólise e inativação enzimática. As

principais conseqüências da oxidação protéica sobre a qualidade de produtos cárneos verificam-se sobre a coloração, sendo que esta se deve fundamentalmente ao estado da proteína muscular mioglobina. A mioglobina é uma proteína conjugada constituída por uma parte protéica (globina) e um grupo prostético de natureza não peptídica (grupo heme) (ROTTA, 2007).

### 2.3 Antioxidantes

Segundo as definições do FDA (Food and Drug Administration), os antioxidantes são substâncias que, adicionadas aos alimentos, permitem prolongar sua vida de prateleira, evitando a ocorrência de descoloração e o surgimento dos sabores desagradáveis ocasionados pela oxidação lipídica e/ou protéica. O uso de antioxidantes deve respeitar os limites máximos descritos na legislação a fim de que seja minimizada a ingestão destas substâncias pelo consumidor (GARCIA et al., 2002).

Segundo DALLA SANTA (2008), os antioxidantes são substâncias capazes de seqüestrar ou impedir a formação de radicais livres. O mecanismo de ação dos antioxidantes está bem elucidado, sendo necessário que ele iniba a formação de radicais livres na iniciação da cadeia de oxidação ou interrompa sua propagação.

A classe de aditivos compreende tanto substância de origem natural como também de substâncias sintéticas. Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são o BHT (butilhidroxitolueno), BHA (butilhidroxianisol) e TBHQ (butilhidroquinona terciária). O emprego de agentes oxidantes sintéticos visando o aumento do prazo de validade de produtos alimentícios tem sido freqüentemente utilizado devido ao seu baixo custo, estabilidade e eficácia. Porém, durante as duas últimas décadas, tanto consumidores quanto a legislação têm levantado suspeitas à inocuidade dos antioxidantes sintéticos (POKORNÝ, 1991).

No Brasil, o uso de aditivos com função antioxidante em produtos cárneos é definido de acordo com o estabelecido na Portaria número 1004 de 11 de dezembro de 1998 - ANVISA, (BRASIL, 2009). Essa Portaria não autoriza o uso de antioxidantes em carnes frescas e congeladas *in natura*, mas permite a adição,

por exemplo de BHA e BHT em alguns produtos cárneos industrializados, em quantidades de 0,01 g de antioxidante por 100g de produto (PEREIRA, 2009).

O ácido eritórbico e o seu sal de sódio são fortes agentes redutores e atuam na redução do oxigênio molecular. O ácido eritórbico é o isômero D do ácido ascórbico, portanto não apresenta atividade biológica e não ocorre naturalmente em alimentos, tem atividade antioxidante menor que o ácido ascórbico oxidando mais rapidamente no alimento. O eritorbato de sódio ( $C_6H_7NaO_6$ ) é um conservante antimicrobiano e agente antioxidante. Potencializa a ação curativa dos nitritos em carnes, estabiliza o aroma e a cor da carne. Como um antioxidante, ajuda a melhorar a estabilidade do sabor de maneira similar a vitamina C, e ajuda a prevenir a formação das nitrosaminas carcinogênicas (ARAÚJO, 2005).

### **2.3.1 Antioxidantes Naturais**

O interesse pelos antioxidantes naturais teve início na década de 80 diante da comprovação de efeitos maléficos causados por doses elevadas de BHT, BHA e TBHQ sobre o peso do fígado e marcado aumento do retículo endoplasmático, entre outras. Como consequência, ênfase foi dada à identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante, provenientes de fontes naturais, que pudessem atuar sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e limitar o uso de antioxidantes sintéticos POKORNÝ (1991).

Os antioxidantes naturais funcionam como agentes redutores, como inibidores de radicais livres, como quelantes ou como desativadores de metais pró-oxidantes (PIEADADE, 2007).

De acordo com sua modalidade da ação, os antioxidantes naturais podem ser classificados como antioxidantes preliminares (de quebra), que podem reagir diretamente com os radicais do lipídio e os converter em produtos estáveis, ou como antioxidantes secundários (preventivos), que podem abaixar a taxa de oxidação por diferentes mecanismos. Os antioxidantes preliminares atuam mais freqüentemente doando um átomo de hidrogênio, enquanto antioxidantes

secundários podem agir por ligação íons metálicos capazes de catalisar processos oxidativos, pelo seqüestro de oxigênio, absorvendo radiação UV, por inibição de enzimas ou decomposição hidroperóxidos (EKLUND et al., 2005).

Os antioxidantes incluem uma variedade de vitaminas, carotenóides, minerais e fitoquímicos que desativam radicais livres e desse modo impedem o dano às membranas celulares ou ao material genético dentro da célula (MURTAUGH et al., 2004).

Os antioxidantes naturais na dieta humana podem atenuar os efeitos dos genes mutagênicos e carcinogênicos. Alguns antioxidantes, como vitaminas A, C e E, podem minimizar os efeitos colaterais de drogas antineoplásticas e podem melhorar a quimioterapia. Um aumento no teor de antioxidantes da dieta através do aumento da ingestão de frutas e vegetais ricos desses compostos pode diminuir a oxidação do DNA por radicais livres, prevenindo câncer e outras doenças degenerativas. Danos oxidativos a biomoléculas provocadas pelo estresse estão entre os principais fatores de risco para aterosclerose, principalmente através da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) no sangue. Assim, o câncer, aterosclerose e outras doenças degenerativas, são partes de um mecanismo comum (VILELA et al., 2008).

MACEDO (2005), cita que vários estudos têm sido realizados visando o desenvolvimento de extratos naturais com ação antioxidante, para o uso em produtos cárneos. Dentre os quais, estão o uso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), marcela do campo (*Achyrocline satureioides*), casca de batata (*Solanum tuberosum*) que possuem flavonóides e ácidos fenólicos em sua composição. A utilização de extratos é vantajosa, pois não apresentam contaminantes microbiológicos, são desodorizadores e não são visíveis no produto, permitindo a obtenção de produtos padronizados. De acordo com HECK & MEIJA (2007), a erva-mate possui uma capacidade antioxidante maior que o chá verde (*Camellia sinensis*).

Um dos principais grupos de antioxidantes encontrados nas plantas são os compostos fenólicos, estes por sua vez além da atividade antioxidante, também demonstram outras atividades biológicas importantes, tais como: atividades antiinflamatórias, antialérgica, antimicrobiana e anticarcinogênica (ARÇARI,

2009). Segundo PADILHA (2007), os antioxidantes naturais podem funcionar como agentes redutores, como inibidores de radicais livres, como quelantes ou seqüestradores do oxigênio singlete e como desativadores de metais pró-oxidantes. Os fotoquímicos que apresentam em sua estrutura um anel aromático com uma ou mais hidroxila recebem a denominação de compostos fenólicos e geralmente apresentam atividade antioxidante.

A concentração de polifenóis na erva-mate tem uma forte correlação com a capacidade antioxidante deste produto (CHANDRA & MEJIA, 2004). É rica em polifenóis hidrossolúveis, tais como ácido isoclorogênico, ácido cafeico e ácido clorogênico, aos quais foram atribuídas a capacidade antioxidante e podem conferir para suas infusões, um papel hepatoprotetor (função de auxílio ao fígado) e reforçar a defesa antioxidante do organismo humano. JACQUES (2005), salienta ainda que foi comparado e determinado os teores de polifenóis e a capacidade antioxidante de *Ardisia compressa*, *Camélia sinensis* e *Ilex paraguariensis*, sendo que as folhas de erva-mate apresentaram uma capacidade antioxidante elevada frente ao ácido gálico em comparação com as outras plantas.

MOLIN (2009) relata que pela habilidade de prevenir a oxidação de lipossomos, os extratos de *Ilex paraguariensis* possuem atividade antioxidante duas vezes superior se comparadas com vinho tinto. Os estudos *in vitro* realizados, até o presente momento, apontam para o importante papel dos polifenóis nas atividades antioxidante e sequestradora de radicais livres, demonstrada para esta espécie (SILVA, 2007).

A utilização de plantas e ervas como antioxidantes em alimentos processados está se tornando cada vez mais importante na indústria da alimentação como uma alternativa aos antioxidantes sintéticos. MILANI et al. (2001) em estudo comparativo do efeito antioxidante de extratos hidroetanólico e metílico de casca de maçã, folhas de alcachofra e erva-mate em carne mecanicamente separada (CMS) de frango mantidas sob refrigeração e congelamento, constataram através do índice de TBARS que o extrato metílico de erva-mate apresentou maior poder antioxidante, com determinação de 1,68 mg de malonaldeído por kg de amostra, enquanto que os demais extratos testados

apresentaram 7,95 mg de malonaldeído por kg de amostra. 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 (1,75 mg de malonaldeído/kg de amostra). PRECI (2010) na elaboração de logurtes *light* tradicional e probiótico, acrescidos de extrato de erva-mate (0,1 e 0,25 % de extrato) e armazenado por 60 dias sob refrigeração (4 °C), apresentaram diferença significativa em relação as formulações que não receberam a adição de extrato (0,013 a 0,019 para 0,024 a 0,035 mg de malonaldeído/kg de amostra, para formulações com e sem extrato, respectivamente), comprovando a ação antioxidante da presença do extrato da erva-mate no produto. FAION (2010) em queijo Prato adicionado de cultura adjunta (*Lactococcus Lactis* ssp. *lactis* e *cremoris*) e extrato de erva-mate (0,1 e 0,2 %) observou ação do antioxidante natural frente a oxidação de proteínas e lipídios.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta e preparo das amostras de erva-mate

As folhas de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) foram colhidas de um cultivo homogêneo de produção a pleno sol, localizada no interior do município de Barão de Cotegipe – RS, sob as coordenadas 27°37'15" S, 52°22'47" W, e 765 m de altitude. Folhas de pequenos ramos (6 meses), foram coletadas no período da tarde, sendo acondicionadas em sacos de tecido (algodão) e posteriormente, submetidas à pré-desidratação com exposição ao sol, durante 30 minutos (Figura 1a). Em seguida, submetidas à operação de pré-maceração (Figura 1b) onde as folhas foram distribuídas em tecido de algodão branco, envolvendo-as em forma de rolo, sendo realizadas torções em direções opostas durante 5 minutos e em ambiente com temperatura entre 18 e 20°C (Figura 1).



**Figura 1-** Aspectos das folhas de erva-mate após exposição de 30 minutos ao sol (a) e submetidas à operação de "rolagem e torção" das folhas (b), respectivamente.

Após a pré-maceração as folhas foram distribuídas em bandejas e mantidas em câmara de maturação (Menoncin) em temperatura de 4°C e umidade relativa de 96°C durante um período de 6 horas, com ausência de luminosidade (Figura 2b). Em seguida, as folhas foram dessecadas em estufa com renovação e

circulação de ar (marca Marconi), com temperatura de 30°C durante 20 horas h (Figura 2c).



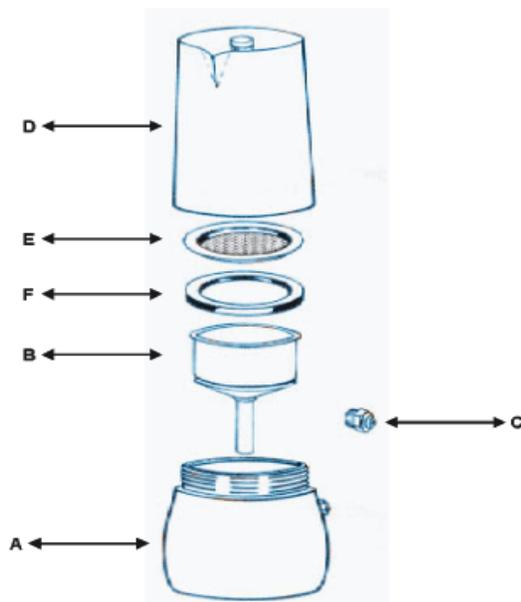
**Figura 2** - Aspectos das folhas de erva-mate: (a) pré-maceradas, (b) Após 6 horas em câmara á 4°C, (c) Dessecas em estufa a 30°C, respectivamente.

Posteriormente, as folhas foram trituradas durante 20 segundos, na velocidade 2, utilizando um triturador de facas Máster Mixer (marca Walita). Logo após, a amostra foi classificada por tamanho (2,36 mm), peneira da série TYLER (mesh 16) sendo possível homogeneizá-la, descartando a fração retida na peneira.

### 3.2 Obtenção do extrato de erva-mate

A extração de solúveis da erva-mate foi efetuada segundo metodologia descrita por VALDUGA (2002) em um extrator por percolação de solvente (Bialetti) (Figura 3) onde: A - depósito do solvente; B – filtro; C – válvula de segurança; D – coletor de extrato; E – filtro; F – borracha de vedação. O cilindro é conectado no interior do extrator. Através de fornecimento de calor, a água percola a erva-mate moída extrai os solúveis na parte superior do extrator. Para

uma única extração, a porcentagem de solúveis extraídos, com relação à massa de erva-mate pode atingir 35,5 %, em extração, neste processo utilizou-se 350 mL de água, 24 g de folhas de erva-mate trituradas a temperatura do extrato de 96°C.



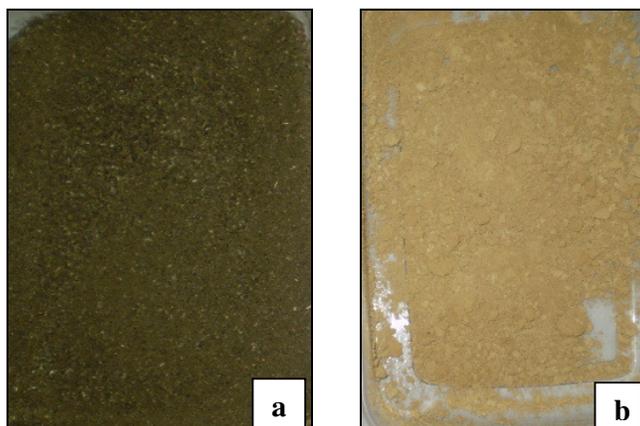
**Figura 3** - Extrator de solúveis por percolação de solvente

A secagem do extrato de erva-mate foi realizada em um secador por atomização (LabPlant SD-05 Spray drying) produzindo partículas sólidas de solúveis de erva-mate conforme descrito por VALDUGA (2002). O extrato de erva-mate é bombeado com uma bomba peristáltica até um atomizador. O ar aquecido é admitido no interior da câmara de secagem onde ocorre evaporação instantânea da umidade contida nas gotículas de solução de erva-mate. Como resultado da secagem, são produzidas partículas sólidas de solúveis de erva-mate. O próprio ar de secagem constitui o veículo de arraste do pó de extrato de erva-mate formado. A corrente ar-sólido é admitida em um ciclone onde ocorre a separação do pó de erva-mate. A Figura 4 apresenta a vista frontal do secador por atomização operando na secagem do extrato de erva mate.



**Figura 3-** Vista Frontal do secador por atomização.

Para obtenção do extrato de erva-mate foi utilizada metodologia descrita por VALDUGA (2002), utilizando temperatura de ar 190°C, vazão de ar admitida pelo soprador de 47 m<sup>3</sup>/h e vazão do extrato admitida no secador de 600 mL/h. O extrato atomizado, foi acondicionado em recipientes de vidro âmbar hermeticamente fechado até o momento da adição no salame. O mesmo foi submetido à análise de atividade antioxidante *in vitro*. A Figura 5 corresponde a aparência do pó triturado da folha de erva-mate e do extrato após a passagem pelo *spray dryer* originando o extrato da erva-mate o qual foi utilizado para a realização dos experimentos.



**Figura 4** - Aspecto do extrato em pó de erva-mate: a - Folhas de erva-mate dessecadas em estufa e trituradas; b - Extrato em pó obtido dos solúveis da erva-mate após secagem em *spray dryer*, respectivamente.

### 3.3 Atividade antioxidante do extrato em pó

A capacidade de sequestrar radicais livres foi determinada utilizando o radical estável 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) de acordo com o método de BRAND-WILLIAMS et al. (1995), com modificações. Aos extratos (750 µL) foi adicionado 1,5 mL de uma solução DPPH em acetona na concentração de 20 mg/mL (preparado diariamente). O meio de reação foi mantido em temperatura ambiente durante os 20 minutos do ensaio. Quando o DPPH reage com um antioxidante que pode doar hidrogênio ele é reduzido. As mudanças na coloração (de violeta escuro para amarelo claro) são medidas em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm. A leitura do decréscimo da absorbância foi realizada em diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 e 20 min, APÊNDICE A - Figura 23). A equação 1 utilizada para o cálculo do percentual de captação do DPPH foi a seguinte:

$$AA (\%) = \frac{[(\text{Abs. do branco do DPPH}) - (\text{Abs. final da amostra} - \text{Abs. do branco da amostra})] \times 100}{\text{Abs. do branco do DPPH}} \quad (1)$$

Onde:

- Abs. = absorbância
- Branco do DPPH: 0,75 mL de acetona + 1,5 mL da solução de DPPH
- Branco da amostra: 0,75 mL da amostra + 1,5 mL de acetona

A determinação foi feita em espectrofotômetro UV-Visível (Agilent Technologies, modelo 8453E). Para verificação de interferentes da metodologia empregada, diluiu-se o extrato de erva-mate em etanol, na mesma faixa de concentração em estudo. Analisaram-se as amostras em espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm, com o objetivo de avaliar a absorbância das diferentes concentrações das amostras. Após, determinou-se a faixa de concentração na qual não ocorreria interferência da coloração do extrato. Após a avaliação da faixa de concentração ideal, calculou-se a concentração de extrato

necessária para capturar 50 % do radical livre DPPH (IC<sub>50</sub>) por análise de regressão (CARBONARI, 2005).

### 3.4 Elaboração das formulações de Salame

As formulações de salame - Tipo Italiano foram processadas na usina de carnes e derivados da URI - Campus de Erechim. A formulação controle (Tratamento 1) de salame - Tipo Italiano foi elaborada com os seguintes ingredientes: carne suína (600 g/kg), carne bovina (300 g/kg), toucinho (100 g/kg), sal (25 g/kg massa carne), sacarose (10 g/kg massa carne), nitrito e nitrato de sódio (0,3 g/kg massa carne), pimenta branca (0,6 g/kg massa carne), pimenta preta (0,5 g/kg massa carne), cultura starter (0,25 g/kg massa carne) e outras especiarias (38,5 g/kg massa carne). A Tabela 1 apresenta as formulações elaboradas para os diferentes tratamentos.

**Tabela 1** - Especificações das formulações de salame testadas.

Tratamento	Composição
1	Padrão* sem adição de antioxidantes
2	Padrão com 0,3 % (p/p) de extrato de erva-mate
3	Padrão com 0,4 % (p/p) de extrato de erva-mate
4	Padrão com 2,0 g/kg eritorbato de sódio

\* Formulação Padrão dos embutidos – Tipo Italiano

As carnes foram mantidas sob refrigeração (4°C) por 24 horas e trituradas em moedor (Frigomaq). A cultura starter mista (COMBISTART 1505 – ANEXO A) utilizada era composta de *Staphylococcus carnosus* e *Lactobacillus pentosus*. O *S. carnosus* é adicionado com a finalidade de desenvolver a coloração e o aroma do salame. O *L. pentosus*, por ser uma cultura homofermentativa, produz ácido láctico, o qual exerce um controle sobre a flora patogênica, garantindo assim a segurança microbiológica do produto e também contribui para a redução do pH e

na desidratação do produto. Essa cultura foi adquirida na forma liofilizada, em sachês de 25 g e mantida sob refrigeração até o momento de sua utilização.

Para o preparado da massa, inicialmente a carne suína foi moída em disco de 10 mm e a carne bovina em disco de 5 mm, o tocinho foi cortado com auxílio de facas, em cubos de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>. Em seguida, na misturadeira (Frigomaq) adicionou-se o cloreto de sódio, para a extração das proteínas miofibrilares e os demais ingredientes. O último ingrediente adicionado foi a cultura starter, o qual foi preparada 30 minutos antes da adição à mistura (2 mL de água destilada para cada 1 Kg de massa cárnea a 20°C), conforme procedimentos recomendados por TERRA & BRUM (1998).

A massa cárnea foi embutida em triplas artificiais de colágeno de 60 mm de diâmetro. Antes de embutir o produto, a tripa de colágeno foi hidratada em solução de água e sal (10 %, p/v). Este procedimento se faz necessário para que a tripa fique mais elástica e resista à pressão do embutimento, evitando a ocorrência de rompimento do material. Após o embutimento, as amostras foram submetidas a um banho de fungo starter *Penicillium nalgiovense* (1g/L) e posteriormente transferidas para uma câmara climatizada com temperatura e umidade controlada.

### **3.5 Maturação e armazenamento do Salame**

As amostras de salames foram acondicionadas na câmara de maturação (Menoncin) com umidade e temperatura controlada. As condições utilizadas na câmara de maturação durante o processamento dos salames estão descritos na Tabela 2. As amostras foram mantidas na câmara climatizada até os 21 dias de armazenamento, quando a  $A_w$  atingiu valores em torno de 0,79, parâmetro utilizado para concluir a fabricação (TERRA & BRUM, 1998).

**Tabela 2** - Condições operacionais da câmara de armazenamento.

<b>Período (Dias)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Umidade Relativa (%)</b>
1	25	95
2	24	92
3	23	89
4	22	86
5	21	83
6	20	80
7	19	80
8 – 20	19	80
21	18	75

As amostras foram mantidas na câmara climatizada até os 21 dias de armazenamento (Tabela 2). A partir do 21º dia, foi embalado á vácuo (400 mmHg) os embutidos e armazenados em local com ausência de luminosidade e controle diário de temperatura ( média 18°C).

### **3.6 Determinações físico-químicas das formulações**

As determinações físico químicas ( $A_w$ , pH, umidade, cor, acidez, oxidação lipídica, protéica e nitrito) e microbiológicas (Contagem de bactérias lácticas e Micrococcaceae) foram avaliadas logo após a fabricação, no 2º, 7º, 14º e 21º dia de maturação, sob temperatura e umidade controlada e após 60 dias embalados a vácuo.

Para as análises físico-químicas o salame foi aleatoriamente escolhido e triturado em multiprocessador, homogeneizado e realizado o quarteamento manual, para ser utilizado nas determinações analíticas, constituindo-se assim uma amostra representativa. As análises foram realizadas em triplicata.

#### **3.6.1 Umidade**

A umidade dos salames foi determinada gravimetricamente em estufa de recirculação de ar (Fanem – 320 - SE) a 105 °C por aproximadamente 4 h e/ou até peso constante, segundo metodologia descrita por BRASIL (2005).

### **3.6.2 Atividade de água ( $a_w$ )**

Para determinação da atividade de água foram utilizados 5 g da amostra, efetuando a leitura no aparelho Aqua-lab, modelo CX-2, seguindo metodologia descrita em seu manual. Para calibração do aparelho foi utilizada até o 7º dia de análise, uma solução de cloreto de bário que apresentava  $A_w$  de 0,98 e a partir do 14º dia de armazenamento, uma solução de cloreto de sódio 0,88.

### **3.6.3 pH**

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, utilizando-se pHmetro (Marconi PA - 200) previamente calibrado em solução tampão pH 4 e 7. Para a leitura preparou-se um solução contendo 10 g de amostra de salame em 100 mL de água destilada a temperatura de (20 °C), conforme método n.º 4022 da AOAC (2000).

### **3.6.4 Acidez total**

A acidez total foi determinada por titulação da amostra com hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic), em presença do indicador fenolftaleína, segundo método n.º 947.05 da AOAC (2000). O resultado foi expresso em g de ácido láctico por 100 g de amostra (TERRA & BRUM, 1998).

### **3.6.5 Oxidação de lipídios**

Para avaliar a extensão da oxidação lipídica realizou-se o teste das substâncias reativas ao ácido 2 tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com RAHARJO et al. (1992). A leitura foi realizada por espectrofotometria (Parkin Elmer mod. Lambda EZ150) a 531 nm e a quantificação foi feita mediante a construção da curva padrão do ácido 2 tiobarbitúrico  $10^{-8}$  a  $10^{-7}$  mol/ml. Os resultados foram

expressos em miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra (MDA mg/Kg amostra).

### **3.6.6 Oxidação de proteínas**

Para avaliar a extensão da oxidação das proteínas, realizou-se a determinação do grupo carbonil, conforme metodologia descrita por LEVINE et al. (1990), modificada. A concentração do grupo carbonil foi calculada medindo DNPH (2,4 dinitrofenilhidrazina) quantificado após leitura em espectrofotômetro (Parkin Elmer mod. Lambda EZ150) a 370 nm. A concentração de proteína foi calculada pelo método Bradford (BRADFORD, 1976), após leitura em espectrofotometria UV- visível (Agilent 8453E) a 280 nm e usando uma curva padrão com albumina bovina (0,260 a 2,360 mg/mL) em guanidina 6 M. Os resultados foram expressos em nmol carbonil por mg de proteína.

### **3.6.7 Cor objetiva**

A cor foi determinada utilizando um colorímetro portátil (Minolta CR400), com fonte de luz D65, na escala de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  do sistema CIELab, realizando-se as leituras entre 20 e 25°C. A calibração do aparelho foi realizada seguindo as instruções do fabricante. No espaço colorimétrico CIELAB, definido por  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , a coordenada  $L^*$  corresponde a luminosidade,  $a^*$  e  $b^*$  referem-se às coordenadas de cromaticidade verde (-)/vermelho(+) e azul(-)/amarelo(+), respectivamente.

### **3.6.8 Nitrito**

O teor de nitrito das amostras foi determinado segundo metodologia descrita pelas normas do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005), utilizando o método de Griess-Ilosvay. Após a desproteínização das amostras, os filtrados obtidos foram submetidos à reação de cor com alfa-naftol e leitura em

espectrofotômetro (Parkin Elmer mod. Lambda EZ 150) a 474 nm. A quantificação foi realizada utilizando uma curva padrão de nitrito de sódio (2 a 100 µg/L).

### **3.7 Análises Microbiológicas**

As análises microbiológicas foram realizadas logo após a fabricação, no 2º, 7º, 14º 21º e 60º dias de armazenamento. Para as determinações microbiológicas, o envoltório do salame foi removido assepticamente. De cada amostra foi coletado 25 g e diluída em 225 mL de solução diluente (água peptonada estéril 0,1 %, p/v) e homogeneizadas por 60 segundos. As diluições decimais necessárias foram efetuadas no mesmo diluente, e alíquotas das diluições apropriadas foram semeadas em duplicata, para a determinação da microbiota presente.

#### **3.7.1 Contagem de Bactérias Lácticas**

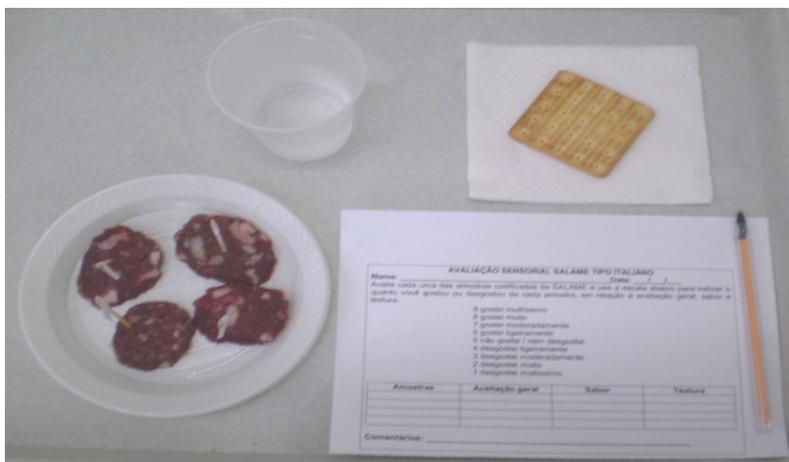
A quantidade de bactérias ácido-lácticas das amostras de salames foi determinada pela técnica de semeadura em profundidade, com a adição de sobrecamada, em placas com Ágar Man Rogosa e Sharpe (MRSA) adicionado de azul de anilina e incubadas em estufa a 35°C por 48 h (SAMELIS et al., 1998). O meio Agar De Man, Rogosa & Sharpe (MRS) com azul de anilina permite um melhor reconhecimento das colônias de bactérias lácticas, isto se deve ao fato de que as bactérias lácticas têm a propriedade de assimilar o azul de anilina do meio, além de facilitar o reconhecimento das características morfológicas das colônias (GIRAUD, 1992). A solução do corante foi preparada dissolvendo 0,1 g de azul de anilina em 2,5 mL de água destilada e esterilizada a 121°C por 15 minutos. O corante foi adicionado (0,3 %, v/v) após a esterilização e resfriamento do MRS a 45-50°C.

### 3.7.2 Contagem de Bactérias da Família Micrococcaceae

A quantidade de bactérias da família Micrococcaceae nas amostras de salames foi determinada em placas com Ágar Mannitol Salt (MSA), depois incubadas 35°C por 48h a (SAMELIS et al., 1998).

### 3.8 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada em escala laboratorial, com 30 a 40 provadores não treinados de ambos os sexos, de diferentes faixas etárias (20 a 50 anos), que apresentaram interesse e hábito de consumo regular variável do produto. As amostras (~2 cm de arestas) foram distribuídas em pratos plásticos codificados com números aleatórios de 3 dígitos, distribuição balanceada, juntamente com amostra do branco (água potável e biscoito salgado) e ficha de avaliação (Figura 6). Foi realizado um teste de aceitação do consumidor, escala hedônica estruturada de 9 pontos (1 - desgostei muitíssimo e 9 - gostei muitíssimo) (Figura 7), onde foram avaliados, separadamente, os seguintes atributos: sabor, textura e aceitação geral, segundo metodologia descrita por FARIA & YOTSUYANAGI (2002). As amostras foram avaliadas após 21 e 60 dias de armazenamento.



**Figura 5** - Material utilizado para avaliação sensorial dos Salames Tipo Italiano

<b>AVALIAÇÃO SENSORIAL SALAME TIPO ITALIANO</b>			
<b>Nome:</b> _____		<b>Data:</b> ___/___/___	
Avalie cada uma das amostras codificadas de SALAME e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra, em relação à aceitação geral, sabor e textura.			
9 gostei muitíssimo			
8 gostei muito			
7 gostei moderadamente			
6 gostei ligeiramente			
5 não gostei / nem desgostei			
4 desgostei ligeiramente			
3 desgostei moderadamente			
2 desgostei muito			
1 desgostei muitíssimo			
<b>Amostras</b>	<b>Aceitação geral</b>	<b>Sabor</b>	<b>Textura</b>

**Figura 6-** Modelo da Ficha de avaliação sensorial para o teste de Escala Hedônica.

### 3.9 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância seguida de teste de Tukey para comparação entre as médias dos resultados ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), utilizando o Software STATISTICA versão 8.0.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer deste trabalho, constando a atividade antioxidante do extrato de erva-mate e acompanhamento da estabilidade físico-química, microbiológica e sensorial de formulações de salame - Tipo Italiano (antioxidante artificial: eritorbato de sódio e natural: 0,3 e 04 % de extrato de erva-mate) durante 60 dias de armazenamento.

### 4.1 Atividade antioxidante *in vitro* do extrato de erva-mate

Buscando-se determinar o potencial de uso do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) como agente antioxidante para posterior uso do mesmo no produto, foi avaliada a atividade antioxidante *in vitro* pela captura de radicais livres com o teste de DPPH. A porcentagem de atividade antioxidante (% AA) corresponde à quantidade de DPPH<sup>•</sup> consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH<sup>•</sup> em 50 % é denominada concentração eficiente (CE<sub>50</sub>), também chamada de concentração inibitória (IC<sub>50</sub>). Quanto maior o consumo de DPPH<sup>•</sup> por uma amostra, menor será a sua CE<sub>50</sub> e maior a sua atividade antioxidante (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

Os resultados obtidos após a determinação da atividade antioxidante do extrato de erva-mate em diferentes concentrações encontram-se descritos na Tabela 3. Pode-se observar que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente a concentração de extrato adicionado atingindo 95,67 % de atividade antioxidante para a concentração 500 µg/mL.

**Tabela 3** - Atividade antioxidante (AA) do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Atividade Antioxidante (%)
1	17,65
5	22,94
10	29,78
50	41,80
100	53,90
250	74,56
500	95,67

A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de extrato utilizado forneceu um  $\text{IC}_{50}$  de 157,85  $\mu\text{g/mL}$ , que é a concentração de extrato necessária para apresentar 50 % de atividade antioxidante. Esta atividade antioxidante pode ser considerada adequada, apresentando a mesma ordem de grandeza de atividade de extratos de diversas outras espécies vegetais. Segundo MOLIN (2009), a planta *Ginkgo biloba* é uma das plantas consideradas com alta atividade antioxidante, pois possui um  $\text{IC}_{50}$  de 38,91  $\mu\text{g/mL}$ . PRECI (2010), encontrou em extrato de erva-mate um  $\text{IC}_{50}$  de 254,8  $\mu\text{g/mL}$ , com folhas de erva-mate previamente submetidas a sapeco, enquanto que no presente estudo as folhas da erva-mate foram apenas desidratadas ao sol.

As folhas de erva-mate apresentam elevado conteúdo de flavonóides e cafeoil derivados, responsáveis pelas suas propriedades antioxidantes. A presença de rutina, quercetina e canferol, ambos livres ou como glicosídeos, em várias espécies de *Ilex*, incluindo a *I. paraguariensis*, podem também ser responsáveis em parte pela atividade antioxidante observada na erva-mate (PADILHA, 2007).

Entretanto, diversos autores tem relatado a necessidade de um aumento significativo de concentração para uso em produtos alimentícios, em relação à concentração mínima obtida *in vitro* (até 100 vezes mais) (KOUTSOUMANIS et al., 1998), sendo geralmente a mesma limitada pela aceitação sensorial (HOLLEY

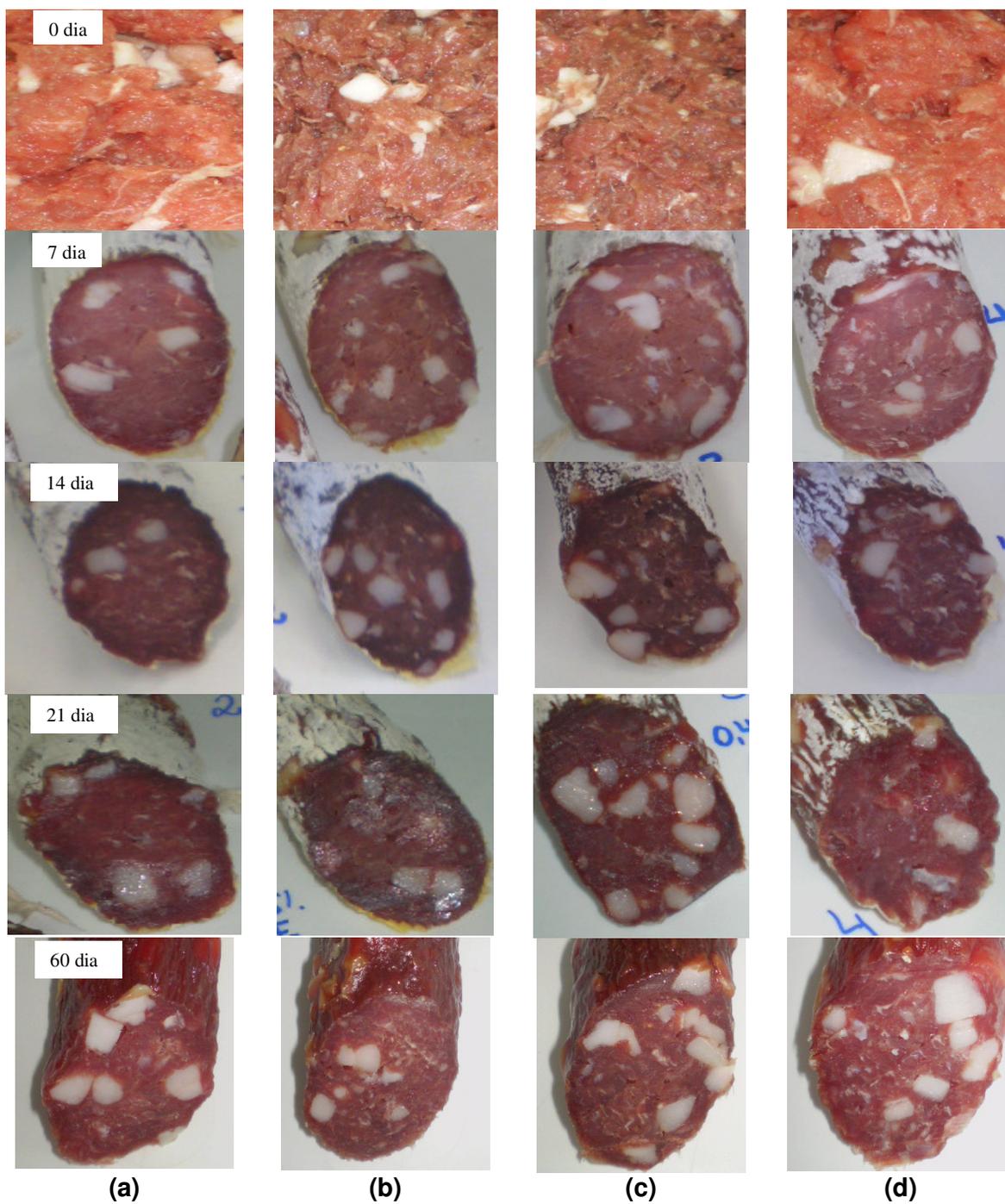
& PATEL, 2005). Como o extrato de erva-mate analisado apresentou uma alta atividade antioxidante *in vitro*, optou-se por formulações de salame - Tipo Italiano com concentrações de extrato de erva-mate de 1,5 a 2 vezes maior do que o salame com antioxidante artificial, ou seja, correspondendo a aproximadamente 20 e 25 vezes o IC<sub>50</sub> obtido.

## **4.2. Características físicas das formulações de salame – Tipo Italiano**

### **4.2.1 Aspectos visuais**

A Figura 8 apresenta o aspecto visual das formulações de salame – Tipo Italiano com os diferentes tratamentos, logo após o processamento e durante o armazenamento em condições controladas na câmara de maturação (Tabela 2) e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados em temperatura ambiente.

Durante todo o processo de maturação dos salames, foi acompanhado a evolução do aspecto físico dos mesmos, e pode-se observar que após a mistura dos ingredientes, a massa que foi adicionado 0,3 e 0,4 % de extrato de erva-mate (Figura 8) apresentou coloração mais escura. A partir do 7º até o 60º dia as formulações controle e com antioxidante artificial (eritorbato de sódio) apresentaram coloração vermelho claro e dureza leve. Enquanto, os que continham em sua composição extrato de erva-mate estavam com textura firme, coloração mais intensa e conseqüentemente na avaliação sensorial característica de sabor mais picante.



**Figura 7** – Aspecto visual da massa das formulações de salame (a - controle; b - 0,3% de extrato de erva-mate; c - 0,4 % de extrato de erva-mate; d - antioxidante artificial) logo após o processamento, salame maturado por 7, 14 e 21, 60 dias, respectivamente.

### 4.2.2. Cor objetiva

O parâmetro "L" mensura a luminosidade e/ou brilho do produto e quanto menores forem tais valores, mais escura é a cor da amostra. O parâmetro "a" representa a coloração vermelha da carne e o valor "b" indica a variação da cor na tonalidade amarela. Assim, para que a coloração dos produtos cárneos permaneça com o tom de vermelho desejado, é esperado que os valores de "b" na amostra sejam baixos e "a" elevados. De acordo com FERREIRA et al. (1994), o brilho (L\*) é o principal parâmetro direcionado a qualidade de cores das carnes, seguida do parâmetro vermelho.

Na Tabela 4 e Figura 9 são apresentados os valores médios de luminosidade (L\*) obtidos nos salames tipo italiano, durante o armazenamento em condições controladas na câmara de maturação (Tabela 2) e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados na temperatura ambiente.

**Tabela 4** - Luminosidade (L\*) das formulações de salame - Tipo Italiano durante o armazenamento.

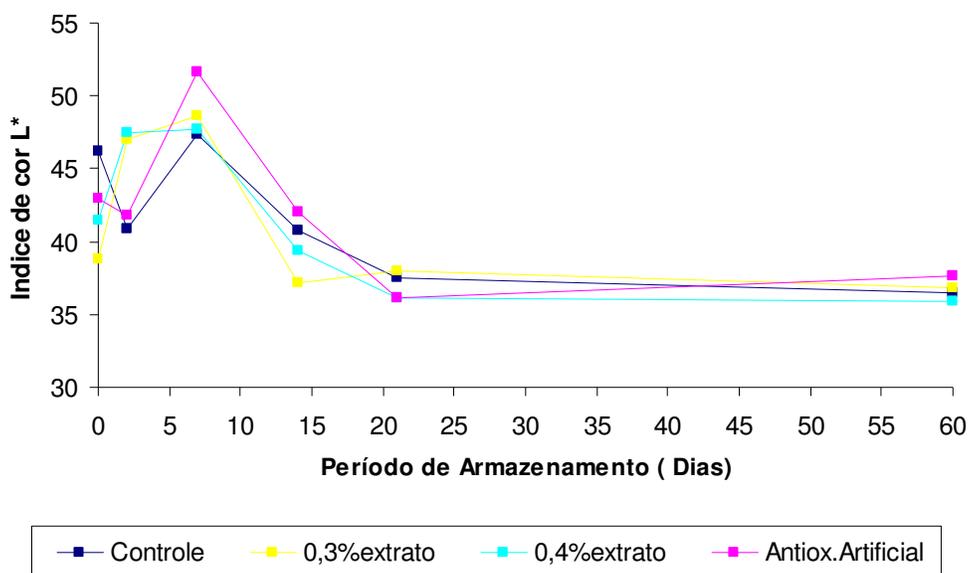
Tratamento	Luminosidade (L*)					
	0 dia	2º dia	7º dia	14º dia	21º dia	60º dia
1	46,20 <sup>aA</sup>	40,87 <sup>bB</sup>	47,39 <sup>aA</sup>	40,72 <sup>aBC</sup>	37,52 <sup>aBC</sup>	36,53 <sup>aC</sup>
(Controle)	(±1,24)	(±1,13)	(±0,64)	(±0,03)	(±1,91)	(±1,18)
2	38,84 <sup>bB</sup>	47,03 <sup>aA</sup>	48,67 <sup>aA</sup>	37,17 <sup>aB</sup>	37,97 <sup>aB</sup>	36,78 <sup>aB</sup>
(0,3% extrato)	(±0,61)	(±1,37)	(±2,34)	(±0,52)	(±4,85)	(±2,41)
3	41,51 <sup>bB</sup>	47,53 <sup>aA</sup>	47,69 <sup>aA</sup>	39,37 <sup>aBC</sup>	36,15 <sup>aC</sup>	35,88 <sup>aC</sup>
(0,4% extrato)	(±3,15)	(±1,23)	(±1,58)	(±0,98)	(±2,74)	(±1,65)
4	43,00 <sup>abB</sup>	41,82 <sup>bBC</sup>	51,69 <sup>aA</sup>	42,09 <sup>aBC</sup>	36,19 <sup>aC</sup>	37,64 <sup>aBC</sup>
(Antiox. Artificial)	(±0,66)	(±2,15)	(±2,16)	(±3,75)	(±1,45)	(±1,42)

\*média (± desvio padrão) seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente a nível de 5% (Teste de Tukey).

Observa-se que os valores de luminosidade na massa do embutido (0 dia) variaram 38,84 a 46,20 (Tabela 4), sendo que nas formulações com 0,3 e 0,4 % de extrato de erva-mate (Tratamentos 2 e 3) e com antioxidante artificial

(eritorbato de sódio) não diferiram entre si ( $p < 0,05$ ). No entanto, os valores de  $L^*$  nas quatro formulações de salames elaborados a partir do 7º dia de armazenamento, não diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ). Os resultados demonstram que a adição de extrato de erva-mate (0,3 a 0,4 %, p/p) não interferiram no brilho do produto.

O salame elaborado sem antioxidante (Tratamento 1) e com eritorbato de sódio (Tratamento 4) apresentaram uma diminuição nos valores de brilho ( $L^*$ ) nos dois primeiros dias, período em que também foi verificado um abaixamento do pH (Tabela 9). No 7º dia de maturação houve um incremento significativo nesta duas formulações. A partir desse período foi verificado um decréscimo na luminosidade para as formulações (Figura 9), sendo que do 14º dia até o 60º dia de armazenamento não foram detectadas diferenças significativas. Segundo SAGGIORATO (2008), o decréscimo nos valores de brilho representa a formação da cor escura em decorrência de reações de escurecimento e da desidratação ocorrida. Onde a mesma encontrou valores inferiores (variaram entre 14,89 a 31,60) aos encontrados neste estudo no 60º dia de processamento.



**Figura 8** – Gráfico de dispersão com os valores da Luminosidade ( $L^*$ ) das formulações – Tipo Salame, durante o armazenamento em condições controladas em câmara de maturação e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados em temperatura ambiente.

MACEDO (2005), em estudo realizado para elaborar salames com culturas lácticas probióticas, obtiveram valores de luminosidade ( $L^*$ ) que variaram de 41,98 e 47,76 no final do processamento (28 dias) e aos 105 dias de armazenamento os valores ficaram entre 41,84 a 52,65. Valores estes superiores aos encontrados neste estudo no final do processamento (60 dias).

Na Tabela 5 e Figura 10 são apresentados os valores médios do índice de cor vermelha ( $a^*$ ) para as formulações de salame - Tipo Italiano, e durante o armazenamento em condições controladas em câmara de maturação (Tabela 2) e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados em temperatura ambiente.

**Tabela 5** - Índice de cor vermelha ( $a^*$ ) das formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento..

Tratamento	Índice de cor vermelha ( $a^*$ )					
	0 dia	2º dia	7º dia	14º dia	21º dia	60º dia
1	9,62 <sup>aC</sup>	13,91 <sup>aAB</sup>	15,35 <sup>aA</sup>	16,14 <sup>aA</sup>	14,50 <sup>aAB</sup>	12,27 <sup>bB</sup>
(Controle)	(±0,69)	(±1,49)	(±0,94)	(±1,03)	(±1,23)	(±0,58)
2	3,07 <sup>bB</sup>	12,45 <sup>aA</sup>	13,12 <sup>aA</sup>	13,83 <sup>abA</sup>	12,55 <sup>abA</sup>	14,82 <sup>aA</sup>
(0,3 % extrato)	(±0,25)	(±0,87)	(±1,32)	(±0,62)	(±1,66)	(±0,37)
3	3,70 <sup>bC</sup>	12,18 <sup>aA</sup>	13,60 <sup>aA</sup>	13,33 <sup>bA</sup>	10,70 <sup>bB</sup>	12,23 <sup>bA</sup>
(0,4 % extrato)	(±1,00)	(±0,11)	(±0,44)	(±0,26)	(±0,58)	(±0,25)
4	11,60 <sup>aA</sup>	12,34 <sup>aA</sup>	13,38 <sup>aA</sup>	14,47 <sup>abA</sup>	11,90 <sup>abA</sup>	13,87 <sup>aA</sup>
(Antiox. Artificial)	(±4,17)	(±1,05)	(±1,00)	(±1,31)	(±0,87)	(±0,33)

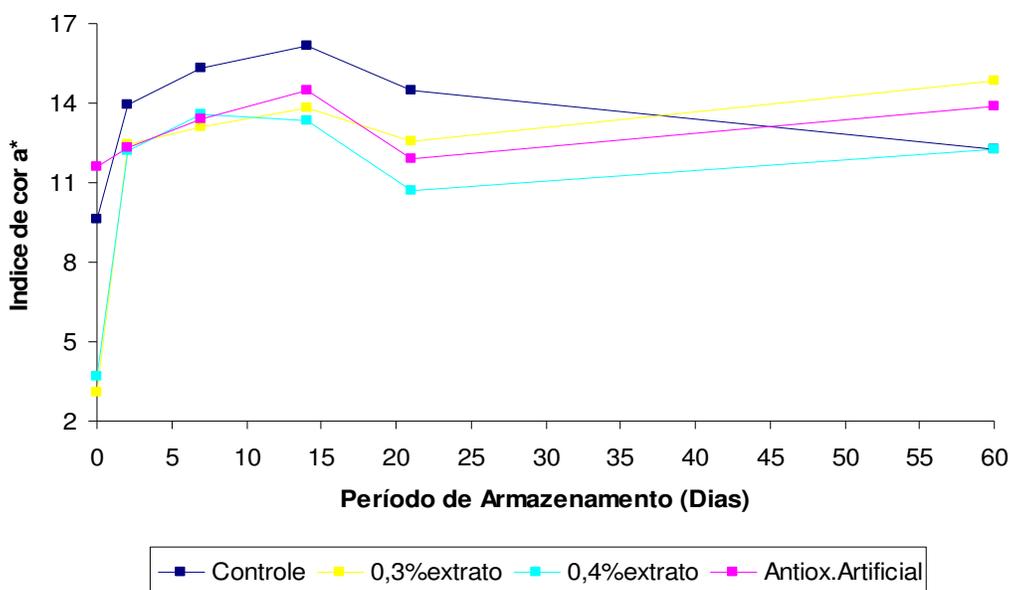
\*média (± desvio padrão) seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente a nível de 5% (Teste de Tukey).

Os antioxidantes usados neste estudo influenciaram na intensidade da cor vermelha ( $a^*$ ). Os dados mostram que a formulação com antioxidante artificial - Eritorbato de sódio (Tratamento 4) apresentou ao 0 dia maior intensidade de cor vermelha (11,60), isto deve-se possivelmente a ação do óxido nítrico, já presente na carne, o qual combina-se com a mioglobina produzindo a nitrosomioglobina que tem coloração vermelha e aumentando este índice. Além disso, o eritorbato de sódio tem a função de acelerar e estabilizar a cor características de produtos

curados com nitrito em função do seu alto poder redutor (LÜCKE, 1998). No entanto, no 2º dia, todos os tratamentos apresentaram um acréscimo na intensidade da cor  $a^*$ , não apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre si.

Segundo TRINDADE et al. (2008), quando o nitrito é adicionado a embutidos nestas condições a primeira reação que ocorre é a oxidação dos pigmentos para metamioglobina, que precisa então ser reduzida e combinada com o óxido nítrico para formar o pigmento final desejado, a nitrosomioglobina. Ainda segundo estes autores a metamioglobina pode combinar-se diretamente com o óxido nítrico para formar a nitrosometamioglobina, que deve então ser reduzida diretamente para formar a nitrosomioglobina.

Os índices de cor vermelha ( $a^*$ ) aumentaram para todos os tratamentos até o 14º dia de processamento (Tabela 5 e Figura 10), o que pode ter ocorrido por causa da acidificação causada pelas bactérias lácticas, pois segundo TERRA & BRUM (1998) a acidificação acelera a formação de cor e a redução de nitrato a nitrito, causada pelos *Staphylococcus*, que aumenta a disponibilidade de oxido nítrico (NO) para reagir com a mioglobina.



**Figura 9** - Gráfico de dispersão com os valores do índice de cor vermelha ( $a^*$ ) em formulações de salame - Tipo italiano, durante o armazenamento em condições controladas em câmara de maturação e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados em temperatura ambiente.

No 60º dia de armazenamento (Figura 10), a formulação com 0,3 % (p/p) de extrato de erva-mate (Tratamento 2) e a com eritorbato de sódio (Tratamento 4) não diferiram estatisticamente nos índices de cor a\*. Os menores índices foram verificados na formulação controle e na com 0,4 % de extrato de erva-mate, de 12,27 e 12,23, respectivamente. No 21º dia de processamento, todos os tratamentos apresentaram uma diminuição no índice de cor vermelha, não apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Alguns autores afirmam que a diminuição da cor vermelha pode ser atribuída a redução da umidade associada ao efeito do ácido láctico nos diferentes estágios químicos da mioglobina (mioglobina, nitrosomioglobina e oximioglobina), pois este ácido pode desnaturar parcial ou totalmente o grupo prostético heme (PELSE et al., 2007).

Na Tabela 6 e Figura 11 são apresentados os valores médios do índice de cor amarela ( $b^*$ ) obtidos nas formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento em condições controladas em câmara de maturação (Tabela 2) e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados em temperatura ambiente.

**Tabela 6** - Índice de cor amarela ( $b^*$ ) das formulações de salame -Tipo Italiano, durante o armazenamento.

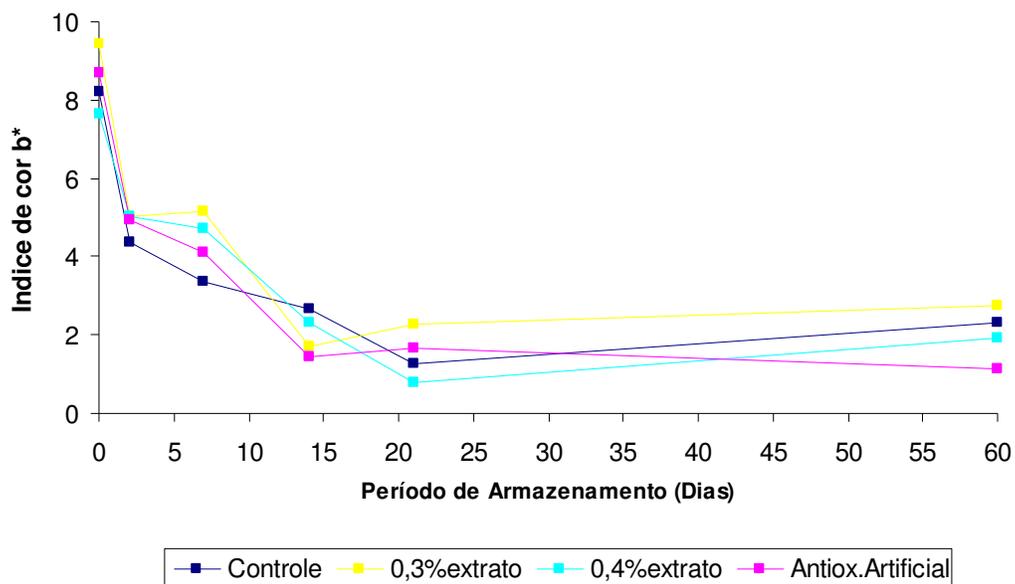
Índice de cor amarela ( $b^*$ )						
Tratamento	0º dia	2º dia	7º dia	14º dia	21º dia	60º dia
1	8,22 <sup>aA</sup>	4,37 <sup>aB</sup>	3,38 <sup>bBC</sup>	2,68 <sup>aC</sup>	1,26 <sup>aD</sup>	2,30 <sup>aC</sup>
Controle	(±1,87)	(±0,33)	(±0,33)	(±0,82)	(±0,71)	(±0,45)
2	9,44 <sup>aA</sup>	5,03 <sup>aB</sup>	5,17 <sup>aB</sup>	1,69 <sup>aC</sup>	2,25 <sup>aC</sup>	2,74 <sup>aC</sup>
(0,3% extrato)	(±1,58)	(±0,81)	(±0,53)	(±0,51)	(±2,25)	(±0,86)
3	7,64 <sup>aA</sup>	5,04 <sup>aB</sup>	4,72 <sup>aB</sup>	2,33 <sup>aC</sup>	1,13 <sup>aD</sup>	1,90 <sup>aCD</sup>
(0,4% extrato)	(±0,30)	(±0,42)	(±0,68)	(±0,32)	(±0,16)	(±0,39)
4	8,68 <sup>aA</sup>	4,93 <sup>aB</sup>	4,12 <sup>aB</sup>	1,42 <sup>aC</sup>	1,66 <sup>aC</sup>	1,15 <sup>aC</sup>
(Antiox.Artificial)	(±0,40)	(±0,62)	(±0,31)	(±0,64)	(±0,66)	(±0,67)

\*média (± desvio padrão) seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente a nível de 5% (Teste de Tukey).

Em relação à intensidade da cor amarela ( $b^*$ ), pode-se observar que logo após a fabricação (Tabela 6), o salame que continha maior concentração de

extrato de erva-mate (Tratamento 3 ) não interferiu na cor, não sendo detectado diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações. Fato este atribuído à coloração do extrato de erva-mate amarelo-castanho claro (Figura 5b).

A partir do 2º dia de processamento todos os tratamentos apresentaram um decréscimo no valor do índice de cor amarela (Tabela 6 e Figura 11), porém entre os tratamentos não foi verificado diferença significativa ( $p < 0,05$ ). O decréscimo observado do 0º dia até 21º dia de armazenamento, segundo PEREZ-ALVAREZ et al. (1999), possivelmente seja decorrente do consumo de oxigênio pelos micro-organismos e a conseqüente diminuição da metamioglobina que ocorrem durante a maturação.



**Figura 10** - - Gráfico de dispersão com os valores médios do índice de cor amarela ( $b^*$ ) em formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento em condições controladas em câmara de maturação e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados em temperatura ambiente.

### **4.3. Características físico-químicas das formulações de salame – Tipo Italiano**

#### **4.3.1 Umidade e atividade de água**

A atividade de água indica a quantidade de água livre contida em um alimento, a qual constitui um meio que possibilita a reprodução, transferência e contaminação microbológica. A atividade de água mede o potencial de biodegradação dos materiais, que é responsável pelas alterações de cor, odor, sabor, textura e *shelf-life* de um produto alimentício. O principal fator na estabilidade de um alimento não é, portanto, o seu teor de umidade, mas sim a disponibilidade de água para o crescimento microbiano e o desenvolvimento de reações químicas (RODRIGUES et al., 1998).

A umidade dos alimentos representa o seu teor de água total, que inclui a água livre, disponíveis para as reações bioquímicas, enzimáticas e aos microorganismos, e a água ligada ou de constituição. A atividade de água representa somente o teor de água livre e por isso, alimentos com o mesmo teor de umidade podem apresentar diferença nos valores de atividade de água de acordo com a quantidade de água livre disponível (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Os valores de atividade de água ( $a_w$ ) obtidos nos salames - Tipo Italiano armazenados durante o período de 21 dias em câmara de maturação sob temperatura e umidade controlada, e após embalados à vácuo, encontram-se descritos na Tabela 7 e Figura 12.

**Tabela 7** - Atividade de água ( $a_w$ ) das formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento.

Tratamento	Atividade de água*					
	0º dia	2º dia	7º dia	14º dia	21º dia	60º dia
1 (Controle)	0,970 <sup>aA</sup> (±0,004)	0,957 <sup>aB</sup> (±0,003)	0,941 <sup>aC</sup> (±0,001)	0,840 <sup>aD</sup> (±0,003)	0,784 <sup>aE</sup> (±0,005)	0,758 <sup>aF</sup> (±0,010)
2 (0,3% extrato)	0,982 <sup>aA</sup> (±0,003)	0,952 <sup>abB</sup> (±0,003)	0,940 <sup>aC</sup> (±0,000)	0,843 <sup>aD</sup> (±0,004)	0,788 <sup>aE</sup> (±0,004)	0,752 <sup>aF</sup> (±0,004)
3 (0,4% extrato)	0,974 <sup>aA</sup> (±0,004)	0,948 <sup>bB</sup> (±0,002)	0,929 <sup>bC</sup> (±0,000)	0,803 <sup>cD</sup> (±0,006)	0,780 <sup>aE</sup> (±0,060)	0,765 <sup>bF</sup> (±0,001)
4 (Antiox. Artificial)	0,980 <sup>aA</sup> (±0,001)	0,944 <sup>bB</sup> (±0,002)	0,936 <sup>aB</sup> (±0,001)	0,825 <sup>bC</sup> (±0,001)	0,759 <sup>bD</sup> (±0,006)	0,790 <sup>aE</sup> (±0,003)

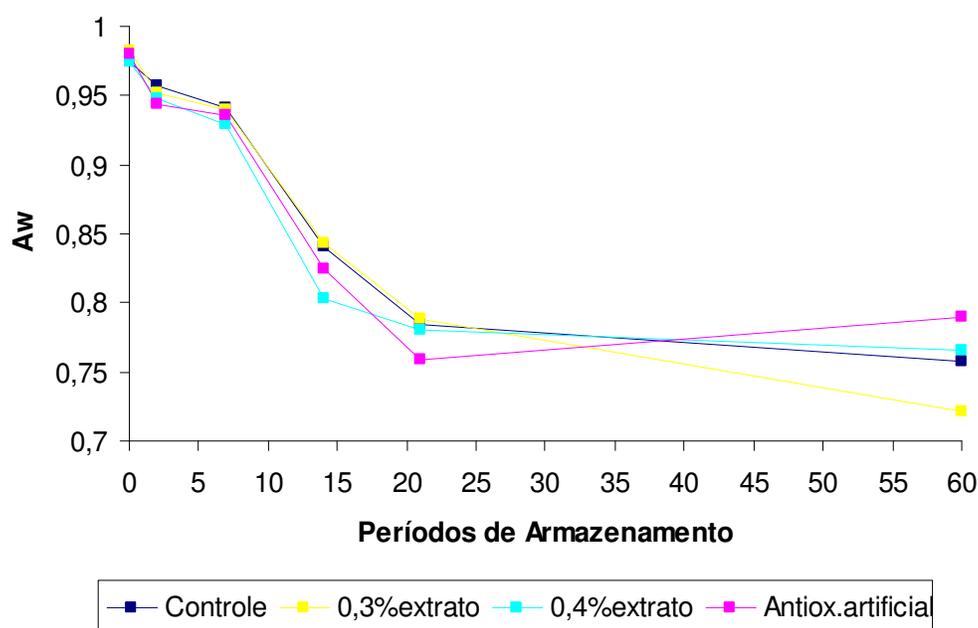
\*média (± desvio padrão) seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente a nível de 5% (Teste de Tukey).

Logo após a sua fabricação (Tabela 7), as formulações de salame – Tipo Italiano apresentaram valores similares (0,990 a 0,974), não apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ). A maior taxa de redução nos valores de  $a_w$  nos salames foi verificada entre o 14º e o 60º dia de armazenamento, uma vez que neste intervalo de tempo ocorreu, também, uma maior redução na umidade dos salames (Tabela 8 e Figura 13).

Observa-se pela Tabela 7, que de maneira geral, houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na atividade de água com a evolução do período de armazenamento, com exceção ao tratamento 4 (Antioxidante artificial) no 2º e 7º dia de armazenamento, onde a redução não foi significativa. Esta redução pode ser atribuída aos decréscimos dos valores de pH (Tabela 9), pois a capacidade de retenção de água das proteínas é diminuída quando o pH se aproxima do ponto isoelétrico, acelerando a desidratação e conseqüentemente, reduzindo o pH. Além do pH, vários outros fatores podem interferir na  $a_w$ , tais como a temperatura, umidade relativa do ambiente e também a quantidade de gordura do produto (SCHWERT, 2008).

Até o 7º dia de armazenamento os valores de atividade de água encontrados nas formulações foram superiores ao valor máximo, recomendado pela legislação (BRASIL, 2000) para esta categoria de produto, que é de 0,900.

A Figura 12, apresenta a evolução da atividade de água das formulações de salame – Tipo Italiano em distintos períodos de maturação e/ou armazenamento. Observa-se que a redução da atividade de água foi progressiva durante a fase de maturação das formulações. Nos 60 dias de armazenamento onde os embutidos estavam embalados a vácuo, o tratamento 4 (antioxidante artificial) apresentou o maior valor de atividade de água (0,790) em comparação com os outros 3 tratamentos. Estudos realizados por GARCIA & GAGLEAZZI (2000) para avaliar as propriedades físicas e químicas do salame tipo italiano durante a secagem e fermentação, apresentou um valor médio de atividade de água no final do processo de 0,88.



**Figura 11** - Gráfico de dispersão com os valores de  $a_w$  em formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento em condições controladas na câmara de maturação e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados na temperatura ambiente.

MARANGONI (2007), estudando o uso de óleo essencial de coentro em salame - Tipo Italiano obteve valores de  $a_w$  na faixa de 0,890 a 0,910 no 21º dia de processamento do salame. Os salames analisados neste trabalho apresentaram valores inferiores para o mesmo período de processamento, com valores de 0,784, 0,788, 0,780 e 0,759 para a formulação controle (Tratamento 1), adicionada de 0,3 e 0,4% de extrato de erva-mate (Tratamentos 2 e 3) e eritorbato de sódio (Tratamento 4), respectivamente, diferindo-se ( $p < 0,05$ ) apenas o tratamento 4 dos demais tratamentos .

SCHEID (2000) utilizou diversas concentrações de cravo-da-índia na fabricação de salame tipo italiano e obteve valores de atividade de água que oscilou entre 0,77 e 0,83 no 25º dia de armazenamento, sendo valores próximos ao encontrado neste estudo que variou entre 0,721 a 0,790 do 21º ao 60 º dia de armazenamento. Segundo TERRA & BRUM (1998), a atividade de água indicada pelas boas práticas de fabricação de salames deve ser de, no máximo 0,86 para comercialização, provavelmente pelo fato de nesta atividade de água a produção de enterotoxina por *S. aureus*, micro-organismo mais resistente à  $a_w$  não é verificada em carnes suína e bovina. Os salames com adição de extrato de erva-mate estão dentro dos padrões para comercialização. Porém, segundo GALLI (1993), os valores encontrados neste estudo é típico de embutidos fermentados.

Os teores de umidade obtidos nos salames - Tipo Italiano, durante o período de 21 dias de armazenamento em câmara de maturação, sob temperatura e umidade controlada e após embalados à vácuo, encontram-se na Tabela 8 e Figura 13.

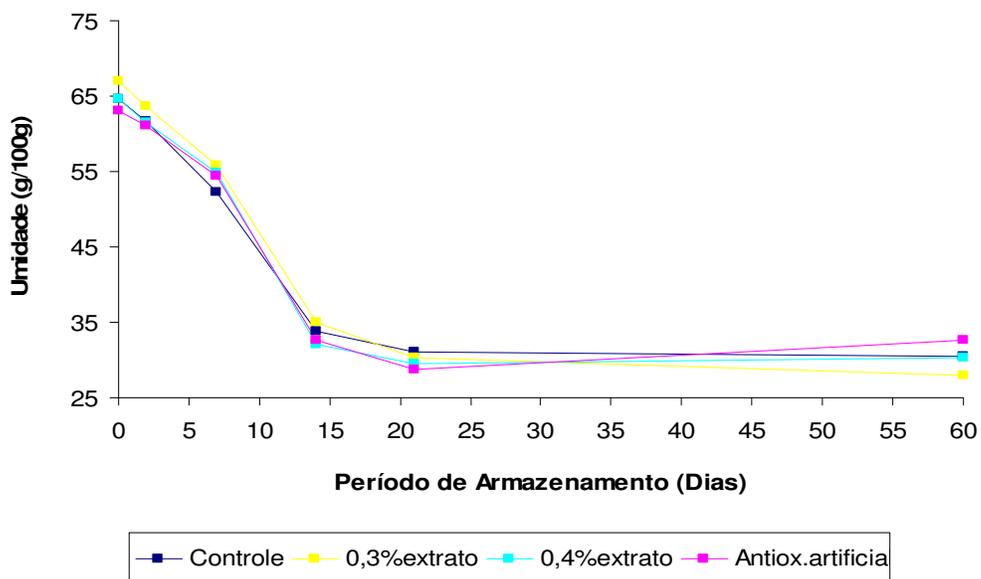
**Tabela 8** - Teores de umidade em formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento.

Tratamento	Umidade (g/100g)*					
	0º dia	2º dia	7º dia	14º dia	21º dia	60º dia
1 (Controle)	64,57 <sup>abA</sup> (±0,36)	61,75 <sup>abA</sup> (±1,50)	52,20 <sup>abB</sup> (±2,67)	33,74 <sup>abC</sup> (±1,87)	31,14 <sup>abC</sup> (±0,94)	30,56 <sup>abC</sup> (±0,20)
2 (0,3% extrato)	67,04 <sup>abA</sup> (±0,62)	63,67 <sup>abB</sup> (±0,44)	55,75 <sup>abC</sup> (±1,20)	35,04 <sup>abD</sup> (±0,91)	30,39 <sup>abE</sup> (±1,47)	27,97 <sup>abE</sup> (±0,56)
3 (0,4% extrato)	64,53 <sup>abA</sup> (±0,80)	61,48 <sup>abA</sup> (±4,55)	54,88 <sup>abB</sup> (±3,40)	32,01 <sup>abC</sup> (±0,16)	29,45 <sup>abC</sup> (±0,65)	30,33 <sup>abC</sup> (±0,54)
4 (Antiox. Artificial)	62,98 <sup>abA</sup> (±2,38)	61,07 <sup>abA</sup> (±2,03)	54,56 <sup>abB</sup> (±3,08)	32,64 <sup>abC</sup> (±1,23)	28,70 <sup>abC</sup> (±0,94)	32,71 <sup>abC</sup> (±0,67)

\*média (± desvio padrão) seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente a nível de 5% (Teste de Tukey).

A Tabela 8 mostra que quando são analisados os efeitos do tempo de fermentação na umidade do salame verifica-se que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o Tratamento 2 (0,3 % extrato de erva-mate) e o Tratamento 4 (Antioxidante artificial), logo após a fabricação dos salames. Os valores de umidade da massa variaram de 67,04 a 62,98 % (p/p). Porém, do 2º até o 21º dias de maturação, não foram verificadas diferenças significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações de salame – Tipo Italiano. Demonstrando que as concentrações de extrato de erva-mate (0,3 e 0,4 %, p/p) não influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) na umidade até o 21º dia de processamento em comparação aos demais tratamentos. Aos 60 dias de armazenamento, as formulações apresentaram teores de umidade na faixa de 27,97 a 32,71 g/100g.

Como pode ser observado na Figura 13, a diminuição da umidade das formulações foi mais acentuada até o 14º dia. Isto deve a fato que durante a etapa inicial de elaboração de embutidos fermentados na câmara de maturação foi utilizado temperaturas altas, seguido de diminuição progressiva à medida que a secagem continuava, juntamente com o decréscimo da umidade relativa (Tabela 2), sendo esta uma prática de rotina no em embutidos fermentados em câmara de maturação (VARNAN & SUTHERLAND, 1998).



**Figura 12** - Gráfico de dispersão com os valores de umidade das formulações de salame - Tipo Italiano, durante o período de 21 dias de armazenamento em câmara de maturação e após embalados à vácuo.

No fim do processamento a umidade variou entre 32,71 a 27,97 (Tabela 9), não apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o tratamento controle e o tratamento 2 (0,3 % de extrato de erva-mate). Observa-se uma diminuição dos valores de umidade entre o início e o fim do processo. Isso se explica devido à desidratação do produto durante a maturação. A diminuição da umidade depende de fatores internos e externos, bem como de uma fermentação láctica eficiente e do tempo de maturação. De acordo com o regulamento técnico de identidade e qualidade do salame tipo italiano, todas as amostras estariam dentro do permitido (no máximo 35%), no período de 60 dias de armazenamento (BRASIL, 2000).

SCHEID (2000), avaliou as características físico-químicas e sensoriais de salame Tipo Italiano com diferentes concentrações de cravo-da-índia, e obtiveram valores de umidade de 63,5 a 72,2 % inicialmente e após 25 dias de processamento os valores variaram de 23,4 a 37,5 %, valores estes semelhantes aos encontrados neste trabalho no 21º dia de armazenamento (Tabela 8).

SAGGIRATO (2008), estudando a atividade antifúngica e antioxidante *in vitro* na superfície de salame tipo italiano do óleo essencial de manjeriço, obteve

valores de umidade na faixa de 24,11 a 31,01 % no 60º dia de permanência na câmara de maturação. Valores estes semelhantes aos encontrados neste trabalho no 60º dia de armazenamento a temperatura de 22°C e embalados a vácuo. MACEDO (2005), encontraram valores de umidade para o salame - Tipo Italiano com adição de probiótico entre 38,54 a 41,48 %, após 25 dias de maturação. Valores estes um pouco acima dos encontrados neste trabalho que após 21 dias de maturação encontraram-se entre 28,70 a 31,14 % (Tabela 8).

### 4.3.2 pH e acidez

A redução do pH é responsável pela liberação de água do produto fermentado, conferindo textura característica deste produto, além de interferir no potencial de membrana dos micro-organismos deteriorantes e patogênicos e reduzir a quantidade de água livre para as suas reações bioquímicas (BRANEN & DAVIDSON, 1983). A evolução do pH no salame - Tipo Italiano armazenados durante 21 dias em câmara de maturação sob temperatura e umidade controlada, e após embalados à vácuo, encontram-se descritos na Tabela 9 e Figura 14.

**Tabela 9** - Valores de pH em formulações em Salame - Tipo Italiano durante o armazenamento.

Tratamento	pH					
	0º dia	2º dia	7º dia	14º dia	21º dia	60º dia
1	6,60 <sup>aA</sup>	5,20 <sup>bB</sup>	5,02 <sup>aC</sup>	4,55 <sup>aD</sup>	5,02 <sup>aC</sup>	5,01 <sup>aC</sup>
(Controle)	(±0,06)	(±0,03)	(±0,07)	(±0,03)	(±0,03)	(±0,01)
2	6,69 <sup>aA</sup>	4,38 <sup>cE</sup>	4,79 <sup>bC</sup>	4,50 <sup>aD</sup>	4,94 <sup>bB</sup>	4,72 <sup>bC</sup>
(0,3% extrato)	(±0,05)	(±0,01)	(±0,03)	(±0,01)	(±0,01)	(±0,01)
3	6,73 <sup>aA</sup>	4,30 <sup>dD</sup>	4,67 <sup>bcC</sup>	4,25 <sup>cE</sup>	4,76 <sup>cB</sup>	4,74 <sup>bB</sup>
(0,4% extrato)	(±0,02)	(±0,01)	(±0,03)	(±0,02)	(±0,02)	(±0,01)
4	6,66 <sup>aA</sup>	5,30 <sup>aB</sup>	4,65 <sup>cC</sup>	4,38 <sup>bD</sup>	4,75 <sup>cC</sup>	4,73 <sup>bC</sup>
(Antiox. Artificial)	(±0,09)	(±0,02)	(±0,01)	(±0,02)	(±0,02)	(±0,01)

\*média (± desvio padrão) seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente a nível de 5% (Teste de Tukey).

Na Tabela 9, observa-se que logo após a fabricação dos salames o pH inicial não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre todos os tratamentos. Conforme esperado, os valores de pH para todos os tratamentos decresceram em função do tempo de permanência na câmara de maturação até o 14º dia, porém nos tratamentos com extrato de erva-mate (2 e 3) ocorreu um pequeno acréscimo no 7º dia, com um decréscimo no 14º dia de armazenamento, seguido de um aumento significativo no 21º dia de armazenamento em câmara de maturação.

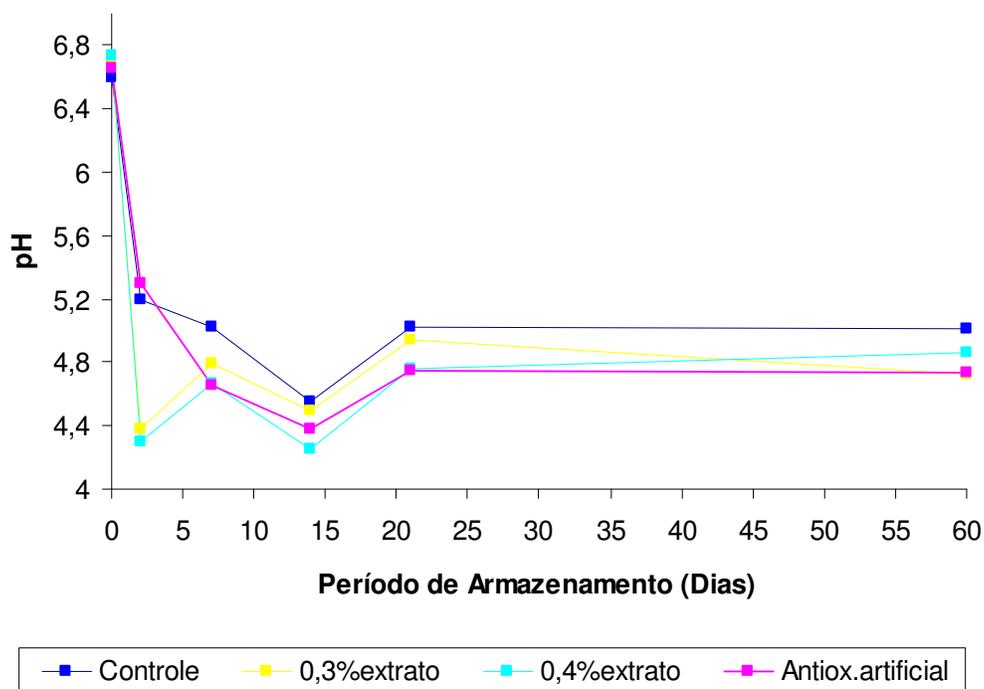
SAMESHIMA et al. (1998) estudaram a queda do pH em salames adicionados de *Lactobacillus rhamnosus* e *L. paracasei* e verificaram que após 24 horas de fermentação, o pH dos embutidos com *L. paracasei* situavam-se entre 5,0 e 5,2. Estes valores mostram-se semelhantes ao valor de 5,20 encontrado para o Tratamento Controle e ligeiramente superior ao valor de 5,3 encontrado para o Tratamento 4 (Antioxidante Artificial), mas isso durante as 48 horas de fermentação. Na produção de salames é importante a diminuição rápida do pH para evitar o desenvolvimento de micro-organismos tanto deteriorantes como patogênicos. O Abaixamento do pH é dependente do rápido desenvolvimento das bactérias lácticas, onde se pode observar conforme Tabela 9, o brusco decréscimo do valor de pH logo após o processamento para o 2º dia de maturação, para todos os tratamentos.

A fermentação dos açúcares pelas bactérias provoca diminuição no pH, o que influencia sobre a estabilidade microbiana, formação da cor e a firmeza do salame, alcançando valor de 5,1 após um ou dois dias de processamento. Essa etapa é bastante importante para as características do salame, tanto do ponto de vista sensorial, como de saúde pública (BELEDELLI, 2009). Fato este observado conforme Tabela 10, onde até o 2º dia de maturação os salames apresentaram pH de 5,2, 4,38, 4,30, 5,30, nas formulações controle, com 0,3 e 0,4 % de extrato de erva-mate e com eritrobato de sódio, respectivamente.

De acordo com a Tabela 9 e Figura 14, foi observado um acréscimo nos valores de pH em todos os tratamentos no 21º dia de armazenamento, devido à proteólise pela produção de amônia em decorrência da atividade enzimática durante a maturação (LÜCKE, 1994). Porém, o pH pode sofrer nova redução

devido à lipólise que libera ácidos graxos livres no meio. A queda do pH nos embutidos fermentados, para valores próximos a 5,0 nos primeiros dias de fermentação, torna o ambiente protegido contra a ação de bactérias gram - negativas a indesejáveis; constituindo a base para sua segurança microbiológica (LÜCKE, 2000; ERKKILÄ et al., 2001).

Os tratamentos 1 (Controle) e 4 (Antioxidante artificial) não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no 7º, 21º e 60º de armazenamento. O tratamento 2 (0,3 % extrato de erva-mate) apresentou comportamento semelhante, mas não diferiu-se significativamente apenas no 7º e 60º dia de armazenamento (Tabela 9).



**Figura 13** - Gráfico de dispersão com os valores de pH das formulações de salame - Tipo Italiano, durante o período de 21 dias de armazenamento em câmara de maturação e após embalados à vácuo.

De acordo com KUMAR et al. (1986), quanto maior o valor do pH, maior a oxidação lipídica. Os resultados obtidos neste trabalho comprovam esta afirmação, uma vez que o maior valor de pH no 60º dia foi para a formulação controle (Tratamento 1) onde apresentou o maior valor de acidez total (0,21 g de

ácido láctico/100g) e TBARS (0,730 mg de malonaldeído/kg) durante a estocagem do salame tipo italiano. O final do processo de fermentação e o início do processo de maturação no salame são caracterizados quando o pH atinge o valor de 5,0 (CHAGAS, 1998).

Pelos resultados apresentados na Figura 14, pode-se notar que a adição de extrato de erva-mate em diferentes concentrações não interferiu nos resultados de pH das amostras, tanto que no 60º dia o resultado final de pH de todas as amostras, inclusive a amostra 1 (Controle) e 4 (Antioxidante Artificial), foram muito próximos, não apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas os tratamentos 2 e 4. Isso demonstra que a adição do extrato de erva-mate não interferiu na atuação dos *starters* que foram adicionados, comparado com o salame que foi adicionado antioxidante artificial.

A Tabela 10 e Figura 15 apresentam os valores de acidez (expressa em termos da quantidade de ácido láctico) obtidos nas formulações de salame - Tipo Italiano, durante o período de 21 dias de armazenamento em câmara de maturação, sob temperatura e umidade controlada e após embalados à vácuo. Os ácidos orgânicos presentes em embutidos influenciam no sabor, odor, cor, estabilidade e na manutenção da qualidade. No salame tipo Italiano o ácido produzido em maior quantidade é o ácido láctico, formado durante a fermentação por bactérias lácticas.

Conforme a Tabela 10 verifica-se que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do tratamento controle em relação aos demais tratamentos, após a fabricação e até o 14º dia de armazenamento. No segundo dia a formulação controle e aquelas que continham extrato de erva-mate (Tratamento 2 e 3), apresentaram um aumento nos valores de acidez, retornando a diminuir no 7º dia.

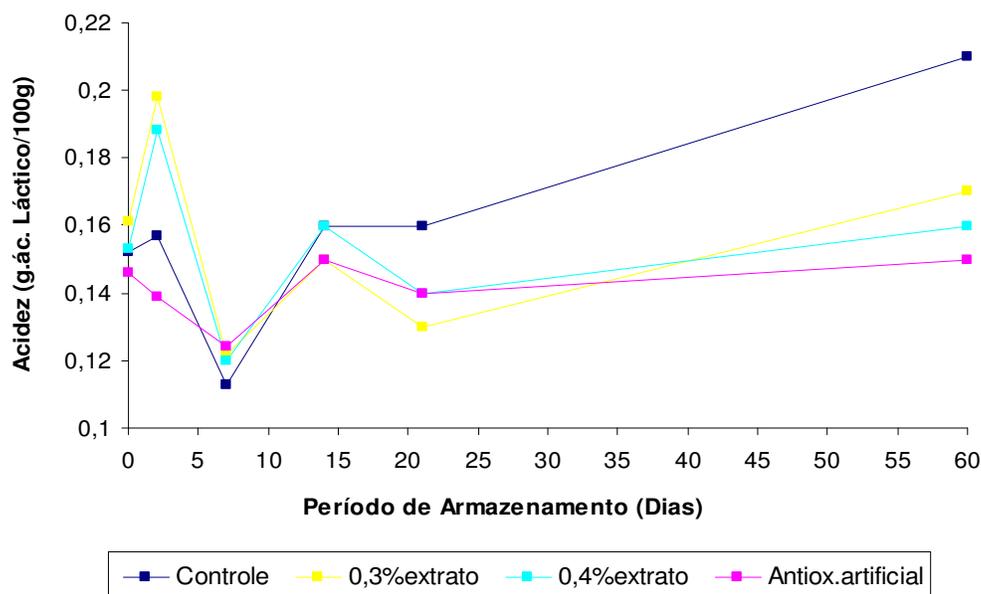
Em relação ao tempo de armazenamento, todos os tratamentos não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) a partir do 7º dia. Porém, o tratamento controle apresentou valores significativamente superiores aos demais tratamentos, no 21º e 60º dia de armazenamento (Tabela 10). Este resultado indica que as formulações que apresentavam antioxidante natural de erva-mate (Tratamento 2 e 3) e eritorbato de sódio, após 21 dias de armazenamento, apresentaram efeitos sobre a acidez do produto final.

**Tabela 10** - Acidez total das formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento.

Tratamento	Acidez Total (g ácido láctico/100g)					
	0	2	7	14	21	60
1 (Controle)	0,15 <sup>aAB</sup> (±0,01)	0,16 <sup>abAB</sup> (±0,03)	0,11 <sup>aB</sup> (±0,01)	0,16 <sup>aAB</sup> (±0,01)	0,16 <sup>aAB</sup> (±0,03)	0,21 <sup>aA</sup> (±0,05)
2 (0,3% extrato)	0,16 <sup>aB</sup> (±0,01)	0,20 <sup>aA</sup> (±0,01)	0,12 <sup>aC</sup> (±0,01)	0,15 <sup>aBC</sup> (±0,02)	0,13 <sup>bC</sup> (±0,01)	0,17 <sup>bB</sup> (±0,01)
3 (0,4% extrato)	0,15 <sup>aBC</sup> (±0,01)	0,19 <sup>aA</sup> (±0,02)	0,12 <sup>aC</sup> (±0,01)	0,16 <sup>aAB</sup> (±0,01)	0,14 <sup>bBC</sup> (±0,01)	0,16 <sup>bAB</sup> (±0,02)
4 (Antiox. Artificial)	0,15 <sup>aA</sup> (±0,01)	0,14 <sup>bA</sup> (±0,01)	0,12 <sup>aA</sup> (±0,01)	0,15 <sup>aA</sup> (±0,02)	0,14 <sup>bA</sup> (±0,01)	0,15 <sup>bA</sup> (±0,02)

\*média (± desvio padrão) seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente a nível de 5% (Teste de Tukey).

O perfil cinético da evolução da acidez nas amostras de salame apresentado na Figura 15 mostra que o aumento mais acentuado ocorreu nos primeiros 2 dias de fermentação, seguido de uma diminuição aos 7º dia e aumento aos 21º dia, que a partir deste período houve pouca variação nos valores de acidez para os tratamentos 2, 3 e 4, porém um aumento no tratamento controle. Os valores finais de acidez foram similares para os tratamentos 2, 3 e 4, indicando que independente da formulação empregada, os valores de acidez são poucos afetados. Os ácidos produzidos durante a etapa de processamento pelas bactérias ácido-lácticas diminuem o pH e contribuem para a formação do produto cárneo fermentado. O ácido láctico caracteristicamente confere um flavor ácido, contribuindo para desnaturação protéica, resultando na textura peculiar dos salames fermentados (SMITH & PALUMBO, 1981).



**Figura 14** - Gráfico de dispersão com os valores médios da acidez Total em formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento em condições controladas na câmara de maturação e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados na temperatura ambiente.

BELEDELLI (2009), em estudo na elaboração de salame Tipo italiano adicionado de selênio, encontrou valores entre 0,12 e 0,11 mg ácido láctico/Kg salame no 28º dia de processamento. Valores estes, próximos ao encontrados neste trabalho no 60º dia nos salames que continham formulação com antioxidante artificial e natural. MOURA et al. (2009), utilizando sálvia como ação antibacteriana e antioxidante na fabricação de salame, obteve valores de acidez de 0,007 mg ácido láctico/Kg, valor este muito abaixo dos encontrados neste trabalho.

#### 4.3.3 Oxidação dos Lipídeos (TBARS) e proteínas

A oxidação dos alimentos é um grande problema durante o armazenamento, o que resulta na deterioração da qualidade dos alimentos. As reações de oxidação de proteínas ocorrerem simultaneamente com a oxidação

lipídica na maioria dos alimentos. A formação dos compostos carbonil (aldeídos e cetonas) são uma das mais proeminentes mudanças nas proteínas oxidadas, servindo sua concentração como um indicativo de oxidação de proteínas, sendo relativamente fácil de medir (LEVINE et al., 1990), como conseqüência é amplamente utilizada para a avaliação da extensão dos danos oxidativos sob diferentes estresses oxidativos.

O teste de TBARS é o método mais usual para acompanhar a evolução da oxidação lipídica em carnes e produtos cárneos (RAHARJO et al., 1992). Os valores da oxidação dos lipídios (TBARS) obtidos nas formulações de salame - Tipo Italiano, durante o período de 21 dias de armazenamento em câmara de maturação, sob temperatura e umidade controlada e após embalados à vácuo, encontram-se descritos na Tabela 11 e Figura 16.

**Tabela 11** - Oxidação de lipídios (TBARS) em formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento.

Tratamento	TBARS (mg malonaldeído/kg)			
	0º dia	7º dia	21º dia	60º dia
1	0,143 <sup>aD</sup>	0,527 <sup>aC</sup>	0,610 <sup>bB</sup>	0,730 <sup>aA</sup>
(Controle)	(±0,020)	(±0,010)	(±0,110)	(±0,040)
2	0,023 <sup>bC</sup>	0,317 <sup>bB</sup>	0,670 <sup>aA</sup>	0,690 <sup>aA</sup>
(0,3% extrato)	(±0,010)	(±0,020)	(±0,080)	(±0,050)
3	0,031 <sup>bD</sup>	0,393 <sup>bC</sup>	0,430 <sup>cB</sup>	0,490 <sup>bA</sup>
(0,4% extrato)	(±0,080)	(±0,020)	(±0,040)	(±0,020)
4	0,058 <sup>bD</sup>	0,279 <sup>cC</sup>	0,280 <sup>dB</sup>	0,350 <sup>cA</sup>
(Antiox. Artificial)	(±0,010)	(±0,010)	(±0,060)	(±0,120)

\*média (± desvio padrão) seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente a nível de 5% (Teste de Tukey).

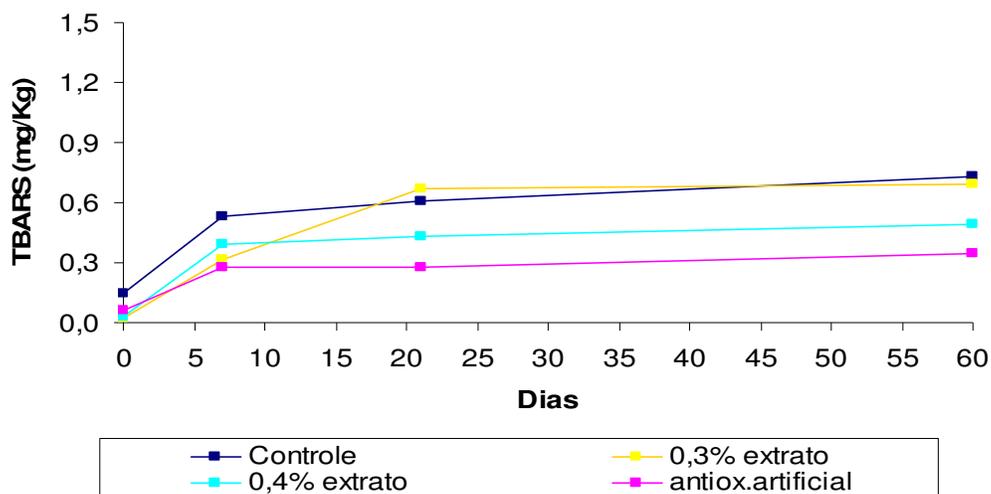
Conforme a Tabela 11, os tratamentos que continham extrato de erva-mate apresentaram os menores valores, logo após a fabricação diferindo-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) apenas do tratamento controle. Observou-se que os valores de oxidação lipídica nos salames contendo 0,3 e 0,4 % de extrato de erva-

mate diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos salames sem adição de antioxidante (Controle), até o 21º dia. Porém aos 60 dias de processamento apenas o tratamento 2 não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do tratamento controle. Constata-se o efeito antioxidante da adição de 0,4 % de extrato de erva-mate em salame - Tipo Italiano, ao se comparar os valores de TBARS em relação ao tratamento controle.

Os valores encontrados nos salames – Tipo italiano durante os sessenta dias de armazenamento, foram menores de 1,0 mg MDA/Kg, sendo que os teores máximos encontrados foram de 0,690 e 0,730 mg MDA/kg nos tratamentos 1 e 2 (Tabela 11).

Vários trabalhos na literatura relatam a correlação entre o TBARS e características sensoriais do produto. AHMAD & SRIVASTAVA (2007), não verificaram odor de ranço em amostras de carne com valores de TBARS de 0,5 e 1,0 mg MDA/Kg. O mesmo ocorreu neste estudo, pois conforme avaliação sensorial, não apresentou sabor ranço nos quatro tratamentos de salame Tipo italiano durante os sessenta dias de armazenamento.

Segundo MOURA et al. (2009) em estudo do óleo volátil de sálvia em produtos carneos, ao 35º dia de armazenamento obteve valores entre 0,652 e 1,413 mg MDA/Kg, valores estes superiores aos encontrados neste trabalho. MARCHESI et al. (2006), ao analisar o valor de TBARS em fatias de salames comerciais já maturados por 32 dias, obteve 0,04 mg de malonaldeído/Kg do produto, valor esse muito inferior ao quantificado para todos os tratamentos analisados neste estudo.



**Figura 15** - Perfil cinético da concentração de TBARS nos salames processados durante o período de armazenamento.

Ao estudar o efeito do óleo de coentro como antioxidante em salame Tipo italiano, MARANGONI (2007), obteve valores de TBARS de 1,39 mg de malonaldeído/Kg no 28º dia de processamento. Sendo que este resultado é 4 vezes superior ao obtido no tratamento 3 (0,430 mg malonaldeído/Kg) no 21º dia (Tabela 11). Em estudo das Características físico-químicas e microbiológicas da superfície do salame - Tipo Italiano contendo solução de lactato de potássio, CICHOSKI & FRANCESCHETTO (2009), obtiveram valores de TBARS no 21º dia entre 0,753 e 1,09 mg MDA/Kg, valores superiores encontrados neste estudo. CAMPAGNOL et al. (2007), em estudo avaliando o efeito de antioxidante natural (0,5 % de extrato hidro-alcoólico de marcela) em meio de cultura de plasma suíno, relatou valores de TBARS com o mesmo comportamento deste estudo, durante o período de armazenamento de 60 dias

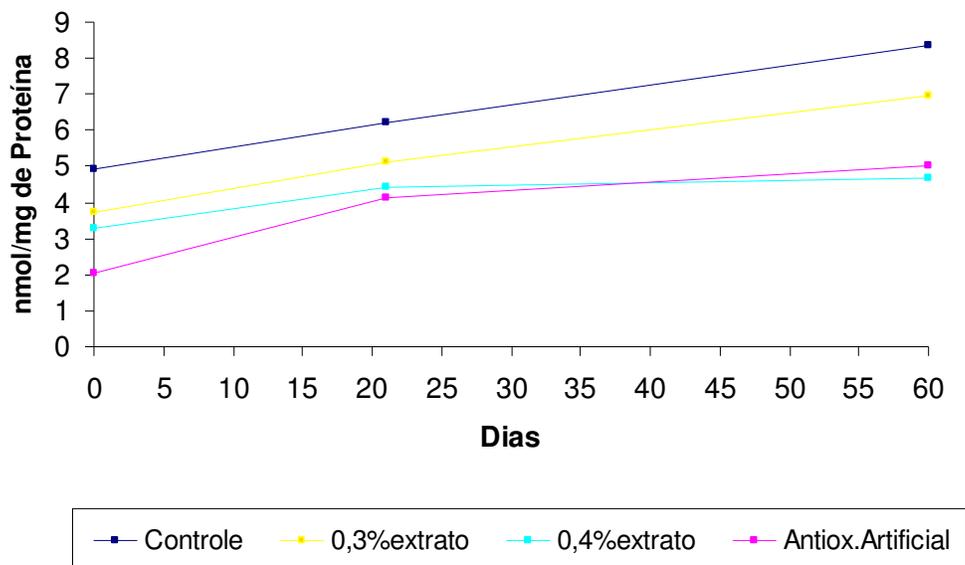
Os resultados obtidos para a oxidação de proteínas através da quantificação dos grupos carbonil obtidos nas formulações de salame - Tipo Italiano, durante o período de 21 dias de armazenamento em câmara de maturação, sob temperatura e umidade controlada e após embalados à vácuo, encontram-se na Tabela 12 e Figura 17.

**Tabela 12** - Oxidação de proteínas em formulações de salame - Tipo Italiano durante o armazenamento.

Tratamento	Oxidação de proteínas (nmol Carbonil/ mg proteína)		
	0 <sup>o</sup> dia	21 <sup>o</sup> dia	60 <sup>o</sup> dia
1 (Controle)	4,902 <sup>aC</sup> (±0,020)	6,236 <sup>aB</sup> (±0,020)	8,374 <sup>aA</sup> (±0,01)
2 (0,3% extrato)	3,735 <sup>bC</sup> (±0,010)	5,117 <sup>bB</sup> (±0,010)	6,953 <sup>bA</sup> (±0,020)
3 (0,4% extrato)	3,279 <sup>bC</sup> (±0,010)	4,434 <sup>cB</sup> (±0,010)	4,690 <sup>cA</sup> (±0,020)
4 (Antiox. Artificial)	2,015 <sup>cC</sup> (±0,010)	4,137 <sup>cB</sup> (±0,020)	4,999 <sup>cA</sup> (±0,010)

\*média (± desvio padrão) seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente a nível de 5% (Teste de Tukey).

Os índices de carbonil na massa do produto após o embutimento foram de 3,735 e 3,279 nmol carbonil/mg proteína para o tratamento com 0,3 e 0,4 % de extrato de erva-mate, respectivamente, não apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre si. No entanto, o tratamento sem antioxidante (controle) diferiu significativamente do com adição de antioxidante artificial, com teores de 4,902 e 2,015 nmol carbonil/mg proteína, respectivamente. Estes resultados demonstram que a formulação controle (tradicional) apresentou os maiores índices de carbonil em relação aos demais tratamentos (Tabela 12 e Figura 17). SAGGIORATO (2008), em salame - Tipo Italiano obteve valores muito superiores aos deste estudo (até 41,56 nmol carbonil/mg proteína).



**Figura 16** - Evolução da oxidação das proteínas medida pelo índice de carbonil do salame tipo italiano durante o período de 21 dias de processamento e após 60 dias de estocagem a temperatura de 22°C.

Ao analisar o comportamento da evolução da oxidação protéica (Figura 17), os quatro tratamentos estudados apresentaram comportamentos semelhantes, tendo um aumento significativo a partir do 21º dia de armazenamento. Os tratamentos 3 e 4 (Tabela 12) não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) a partir do 21º dia. Uma das possíveis causas da elevação do grupo carbonil após 21 dias de armazenamento, poderá estar relacionado à oxidação de lipídios associada à reação de condensação de *Maillard*. Segundo VARNAN & SUTHERLAND (1998) quando ocorre a reação de *Maillard* os aminoácidos sofrem desaminação/descarboxilação oxidativa pela degradação de Streck, sendo este um dos mecanismos prováveis para a origem de numerosos compostos que apresentam o grupamento carbonil, como os aldeídos de cadeia ramificada, 2 e 3 - metilbutanal, fenilaldeído e alfa dicarbonilos. HOWELL et al. (2001) mostraram que a oxidação das proteínas está ligada à oxidação dos lipídios em produtos cárneos.

#### 4.3.4 Nitrito

As formulações de salame – Tipo Italiano, do tratamento controle, com 0,3 e 0,4 % de extrato de erva-mate e com eritorbato de sódio, aos 21<sup>o</sup> dia de processamento apresentaram valores residuais de nitrito de 3,06, 1,85, 1,72 e 0,40 ppm, respectivamente, sendo que foi adicionado na massa 300 ppm da mistura comercial de nitrato/nitrito. Segundo TERRA et al. (2001), a redução dos nitratos é realizada pelas bactérias da família Micrococaceae durante as primeiras 24 horas, quando os níveis de ácido láctico ainda não estão elevados. Estas bactérias possuem um sistema nitrato e nitrito redutase que favorece a ocorrência das reações de cura responsáveis pela coloração típica destes produtos cárneos. Esta atividade bacteriana é favorecida pelas temperaturas relativamente baixas e altas concentrações iniciais de cloreto de sódio.

A concentração de nitrito presente num produto cárneo obtido por salga a seco e por desidratação pode agir como um obstáculo (“Hurdle Technology”) frente às fontes de alterações desse tipo de produto (TERRA et al., 2006). A concentração de nitrito necessária para ocorrência dos diversos efeitos quando seu emprego em produtos cárneos varia entre 30 e 50 ppm para o desenvolvimento de cor, entre 20 e 40 ppm para o desenvolvimento de aroma, entre 80 e 150 ppm para o efeito conservante (MÜLLER,1991) e entre níveis de 20 e 50ppm para o efeito antioxidante (LÜCKE, 2000).

CIROLINI (2008), em estudo realizado em salame - Tipo Italiano utilizando *Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis*, encontrou valores entre 3,28 a 6,09 ppm, respectivamente.

#### 4.4. Avaliação microbiológica das formulações de salame – Tipo Italiano

##### 4.4.1. Bactérias Lácticas

A contagem de bactérias lácticas obtidos nas formulações de salame - Tipo Italiano, durante o período de 21 dias de armazenamento em câmara de

maturação, sob temperatura e umidade controlada e após embalados à vácuo, encontram-se na Tabela 13 e Figura 18.

A concentração de bactérias lácticas presentes no início da fermentação foi variável (6,02 a 6,7  $\log_{10}$  UFC/g). Esses micro-organismos se multiplicam rapidamente e predominam nos primeiros dias de fermentação, alcançando valores em torno de 8  $\log_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup>. Essa concentração se mantém estável durante os primeiros 7 dias de maturação, diminuindo a sua contagem após este período (Figura 18).

**Tabela 13** - Bactérias Lácticas ( $\log_{10}$  UFC/g) em formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento.

Tratamento	Bactérias Lácticas ( $\log_{10}$ UFC/g)					
	0º dia	2º dia	7º dia	14º dia	21º dia	60º dia
1 (Controle)	6,67 <sup>aC</sup> (±0,17)	8,30 <sup>aA</sup> (±0,16)	7,42 <sup>cB</sup> (±0,01)	7,62 <sup>aA</sup> (±0,06)	7,20 <sup>aB</sup> (±0,06)	5,29 <sup>abD</sup> (±0,16)
2 (0,3% extrato)	6,02 <sup>bC</sup> (±0,05)	8,22 <sup>aA</sup> (±0,23)	8,58 <sup>aA</sup> (±0,06)	7,27 <sup>bB</sup> (±0,10)	7,17 <sup>aB</sup> (±0,18)	5,15 <sup>bD</sup> (±0,07)
3 (0,4% extrato)	6,70 <sup>aC</sup> (±0,24)	8,35 <sup>aA</sup> (±0,05)	8,34 <sup>aA</sup> (±0,16)	7,21 <sup>bB</sup> (±0,06)	7,30 <sup>aB</sup> (±0,02)	5,47 <sup>abD</sup> (±0,39)
4 (Antiox. Artificial)	6,70 <sup>aC</sup> (±0,18)	8,50 <sup>aA</sup> (±0,17)	7,81 <sup>bAB</sup> (±0,01)	7,70 <sup>aB</sup> (±0,07)	7,30 <sup>aBC</sup> (±0,14)	5,56 <sup>aD</sup> (±0,05)

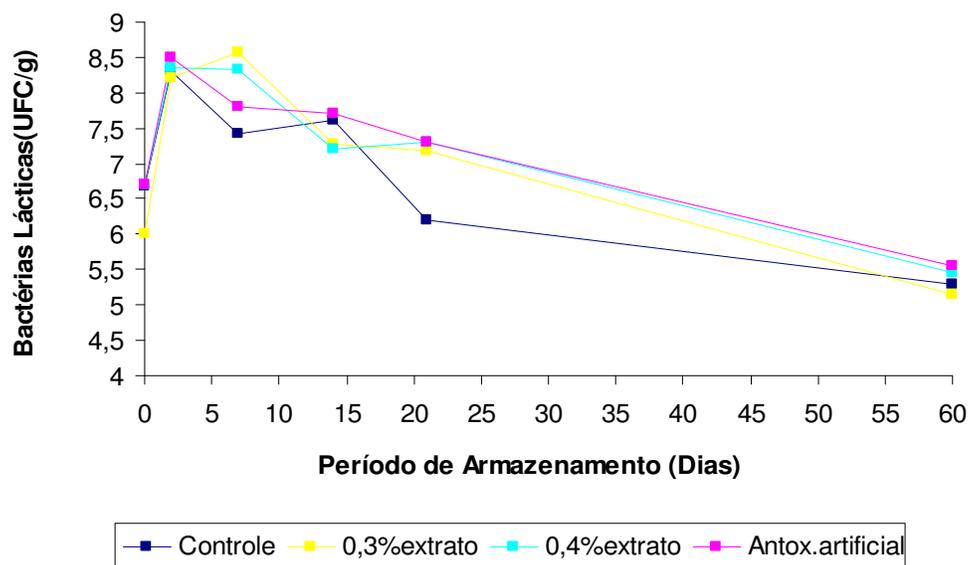
\*média (± desvio padrão) seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente a nível de 5% (Teste de Tukey).

A contagem das bactérias lácticas nas amostras de salame - Tipo Italiano, nos diferentes tratamentos, apresentou aumento significativo no número de células bacterianas a partir do 2º dia de maturação até o 7º dia. O tratamento controle se diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) dos demais tratamentos no 7º dia de maturação. Mantiveram-se com pequenas flutuações até o 21º dia de maturação dentro da câmara com temperatura e umidade controlada (contagem em torno de 6 - 8  $\log_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup>). Estes resultados estão de acordo com RANTSIOU & COCOLIN (2006), que afirmam que após 3 dias de fermentação as bactérias ácido lácticas alcançam uma contagem de 7 a 8  $\log_{10}$ UFC.g<sup>-1</sup>,

permanecendo relativamente sem alterações, em número, durante todo período de maturação. Esta alta população de bactérias ácido lácticas produz ácido láctico, ácido acético e possivelmente bacteriocinas que vão inibir o crescimento de bactérias patogênicas, especialmente *Staphylococcus aureus* (GEISEN et al., 1992; LUCKE, 2000). Os resultados obtidos neste trabalho, também, são semelhantes aos encontrados por DALLA SANTA (2008), que obtiveram contagens em torno de 4 a 8 log<sub>10</sub> UFC/g na avaliação da qualidade de salames artesanais com diferentes culturas *starters*.

A partir do 21º até o 60º dia de armazenamento em temperatura em torno de 22°C e embalados a vácuo, os salames apresentaram um decréscimo, com valores entre 5,15 a 7,30. Aos 60º dias de armazenamento não houve diferença significativa (p<0,05) do tratamento controle, perante as demais formulações. A contagem das bactérias lácticas está relacionada com a adição da cultura *starters* (*Staphylococcus carnosus* e *Lactobacillus pentosus*) no início do processo. As culturas *starters* desempenham importante função ao fermentar carboidratos do meio, liberando ácido láctico e reduzindo pH do meio no segundo dia (ORDÓÑEZ et al., 1999).

Em experimento realizado por SANZ et al. (1997) para avaliar diferentes tempos, temperaturas e umidade relativa durante o processamento de salames, a quantidade de bactérias lácticas no produto final foi em torno de 6 log<sub>10</sub> UFC/g, sendo que durante a fermentação a concentração máxima foi na ordem de 8 log<sub>10</sub> UFC/g, valores semelhantes aos encontrados nesse trabalho.



**Figura 17** - Gráfico de dispersão com o acompanhamento da contagem das bactérias lácticas em formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento em condições controladas na câmara de maturação e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados na temperatura ambiente.

BELEDELLI (2009), demonstrou comportamento similar das bactérias lácticas aos deste trabalho, em estudo sobre a adição de selênio na fabricação de salame tipo italiano. Comportamento similar ocorreu também, em estudo realizado por GAIO (2008), onde no 21º de maturação encontrou valores entre 6,83 a 7,94  $\log_{10}$  UFC/g, pois nesse trabalho encontrou-se valores entre 6,19 a 7,61  $\log_{10}$  UFC/g.

As concentrações testadas do extrato de erva-mate não inibiram os micro-organismos pertencentes a este grupo, não afetando assim o processo fermentativo do produto. Em estudo realizado utilizando uso de culturas iniciadoras para elaboração de um embutido a base de carne de pato, obteve no final do processo, o valor médio final de células viáveis de bactérias lácticas foi de 8,11  $\log_{10}$  UFC/g (CARIONI, 2001).

Na produção de salames é importante a diminuição rápida do pH para evitar o desenvolvimento de micro-organismos tanto deteriorantes como patogênicos. O abaixamento do pH é dependente do rápido desenvolvimento das

bactérias lácticas. A massa cárnea utilizada para produzir salames por fermentação espontânea deve conter quantidade suficiente tanto de bactérias lácticas como de Micrococcaceae para o desenvolvimento adequado da fermentação, obtendo assim um produto seguro e com qualidade (COMI et al., 2005).

#### **4.4.2 Micrococcaceae**

Os micro-organismos da família Micrococcaceae auxiliam na coloração, sabor e aroma dos embutidos fermentados. Contribuem na coloração devido à atividade das enzimas nitrato redutase e catalase, importante para a formação e estabilidade da cor, além de prevenir contra a oxidação lipídica (TERRA et al., 2004). PINTO et al. (2001) relatam que para que haja a formação da cor típica de produtos curados é necessário que o nitrato adicionado à carne sofra redução a nitrito através da ação da enzima nitrato redutase. As bactérias da família Micrococcaceae tem papel fundamental na redução do nitrato, porém sua ação é bastante reduzida em valores de pH menores que 5,4. Dessa forma, uma redução muito rápida do pH no início do processamento dos produtos cárneos pode interferir na obtenção da cor avermelhada característica.

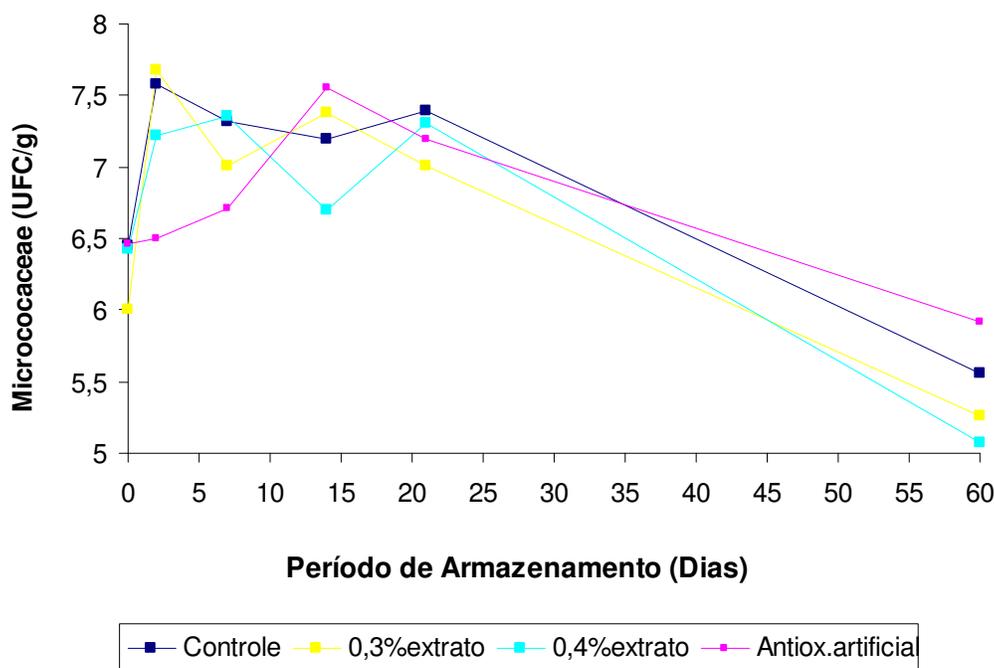
O número de colônias das bactérias pertencentes à família Micrococcaceae obtidos nos salames Tipo italiano, durante o período de 21 dias de armazenamento em câmara de maturação, sob temperatura e umidade controlada e após embalados à vácuo, encontram-se na Tabela 14 e Figura 19.

**Tabela 14** - Contagem de bactérias pertencentes à família Micrococcaceae em formulações de salame - Tipo Italiano durante o armazenamento.

Tratamento	Micrococcaceae (log <sub>10</sub> UFC/g)					
	0º dia	2º dia	7º dia	14º dia	21º dia	60º dia
1 (Controle)	6,44 <sup>bB</sup> (±0,01)	7,58 <sup>aA</sup> (±0,11)	7,32 <sup>aA</sup> (±0,13)	7,20 <sup>bA</sup> (±0,05)	7,39 <sup>aA</sup> (±0,61)	5,56 <sup>aC</sup> (±0,08)
2 (0,3% extrato)	6,01 <sup>cC</sup> (±0,03)	7,68 <sup>aA</sup> (±0,17)	7,01 <sup>abB</sup> (±0,44)	7,38 <sup>abAB</sup> (±0,06)	7,01 <sup>aB</sup> (±0,25)	5,26 <sup>aD</sup> (±0,13)
3 (0,4% extrato)	6,42 <sup>abA</sup> (±0,06)	7,22 <sup>aA</sup> (±0,37)	7,35 <sup>aA</sup> (±0,27)	6,70 <sup>cA</sup> (±0,19)	7,30 <sup>aA</sup> (±0,02)	5,04 <sup>aB</sup> (±0,62)
4 (Antiox. Artificial)	6,46 <sup>abB</sup> (±0,01)	6,50 <sup>bB</sup> (±0,01)	6,70 <sup>bB</sup> (±0,23)	7,55 <sup>aA</sup> (±0,03)	7,19 <sup>aA</sup> (±0,08)	5,92 <sup>aC</sup> (±0,40)

\*média (± desvio padrão) seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente a nível de 5% (Teste de Tukey).

Antes dos salames serem embutidos, a massa cárnea apresentou número de colônias de bactérias - Micrococcaceae entre 6,01 e 6,46 log<sub>10</sub> UFC/g, sendo que as formulações 3 e 4 não apresentando diferença significativa (p<0,05) do tratamento controle. Em estudo realizado por PAPAMANOLI et al. (2002) o número de Micrococcaceae no início da fermentação foi de 3 a 4 log<sub>10</sub> UFC/g, sendo estes valores inferiores aos encontrados neste trabalho.



**Figura 18** - Gráfico de dispersão com o acompanhamento da contagem das bactérias Micrococcaceae em formulações de salame - Tipo Italiano, durante o armazenamento em condições controlada em câmara de maturação e após os 21 dias embalados a vácuo e armazenados em temperatura ambiente.

A partir do 2º dia de maturação até o 21º dia não ocorreram grandes alterações na população destas bactérias, somente no 60º dia ocorreu um pequeno decréscimo apresentando valores entre 5,04 a 5,92 log<sub>10</sub> UFC/g, não apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nas quatro amostras analisadas.

A temperatura de maturação afeta significativamente a concentração final de Micrococcaceae. Durante o período de fermentação, salames produzidos em temperatura de 24 a 26°C, a concentração de Micrococcaceae foi de aproximadamente 7 log<sub>10</sub> UFC/g, e na faixa de 22 a 24°C a contagem ficou abaixo de 6 log<sub>10</sub> UFC/g. Em ambas condições ocorreu uma diminuição de Micrococcaceae na seqüência do período de maturação (SOYER et al., 2005). Comportamento similar ocorreu neste trabalho, onde a temperatura nos sessenta dias de processamento dos salames Tipo italiano, era em torno de 22°C, apresentando valores entre 4,16 a 6,18 log<sub>10</sub> UFC/g.

O baixo número de Micrococcaceae durante o processamento de salames fermentados ou a diminuição da concentração no período de maturação pode ser devido à inibição causada pela diminuição acentuada do pH (SOYER et al. 2005), ocasionado pelo desenvolvimento das bactérias lácticas. Conforme CARIONI et al. (2001), no décimo oitavo dia, o número de células foi de  $8,53 \log_{10}$  UFC/g, apresentando valores muito superiores ao encontrado neste trabalho no decorrer de todo o tempo de maturação e armazenamento dos embutidos.

#### **4.5 Características organolépticas das formulações de salame – Tipo Italiano**

A Tabela 15 apresenta as médias das pontuações das avaliações dos julgadores para as características organolépticas (aceitação geral, sabor e textura) das formulações de salame - Tipo Italiano aos 21 dias de armazenamento em câmara de maturação sob temperatura e umidade controlada e após 60 dias embalados à vácuo.

A finalidade do teste de aceitação é determinar a provável aceitação do alimento pelo consumidor nas fases iniciais de desenvolvimento, como também determinar a aceitação quando promovem alteração e, ou, inclusão de ingredientes e modificação nos processos, nas matérias, na embalagem, nas condições de estocagem e, ou, no tempo de conservação dos alimentos (TEIXEIRA et al., 1987).

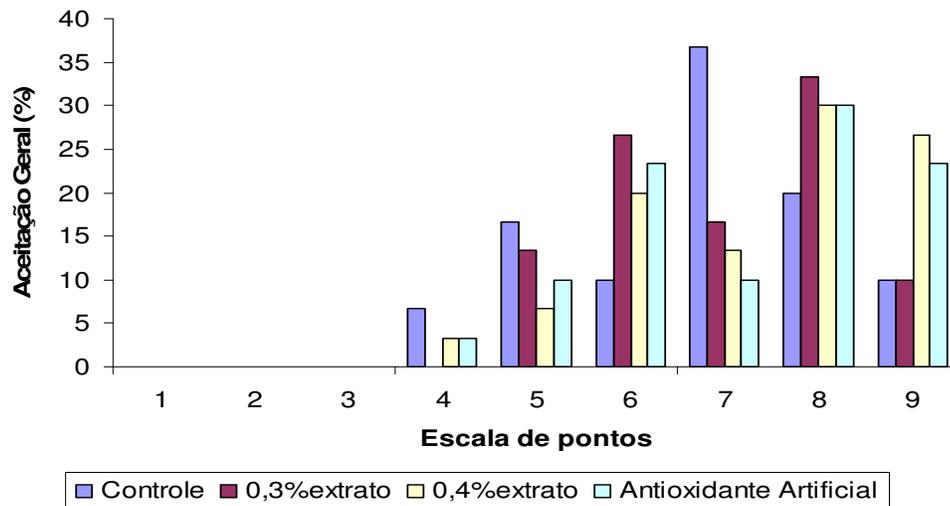
**Tabela 15** - Características sensoriais das formulações de salame – Tipo Italiano durante o armazenamento.

Atributos*	Período (dias)	Tratamento			
		1 Controle	2 0,3% extrato	3 0,4% extrato	4 Antiox. Artificial
Aceitação Geral	21 <sup>o</sup>	6,77 <sup>aB</sup> (±1,40)	7,00 <sup>aB</sup> (±1,26)	7,40 <sup>aB</sup> (±1,43)	7,23 <sup>aB</sup> (±1,48)
	60 <sup>o</sup>	7,19 <sup>aA</sup> (±0,80)	7,58 <sup>aA</sup> (±0,70)	7,65 <sup>aA</sup> (±0,89)	7,73 <sup>aA</sup> (±0,78)
Sabor	21 <sup>o</sup>	6,80 <sup>bB</sup> (±1,12)	7,50 <sup>aA</sup> (±0,94)	7,50 <sup>aA</sup> (±0,86)	7,87 <sup>aA</sup> (±1,14)
	60 <sup>o</sup>	7,27 <sup>bA</sup> (±0,87)	7,53 <sup>aA</sup> (±0,94)	7,47 <sup>aA</sup> (±0,86)	7,90 <sup>aA</sup> (±1,14)
Textura	21 <sup>o</sup>	6,93 <sup>aA</sup> (±1,15)	7,10 <sup>aA</sup> (±1,16)	7,27 <sup>aA</sup> (±1,14)	7,40 <sup>aA</sup> (±1,13)
	60 <sup>o</sup>	6,96 <sup>aA</sup> (±0,98)	7,22 <sup>aA</sup> (±0,75)	7,33 <sup>aA</sup> (±0,83)	7,44 <sup>aA</sup> (±0,85)

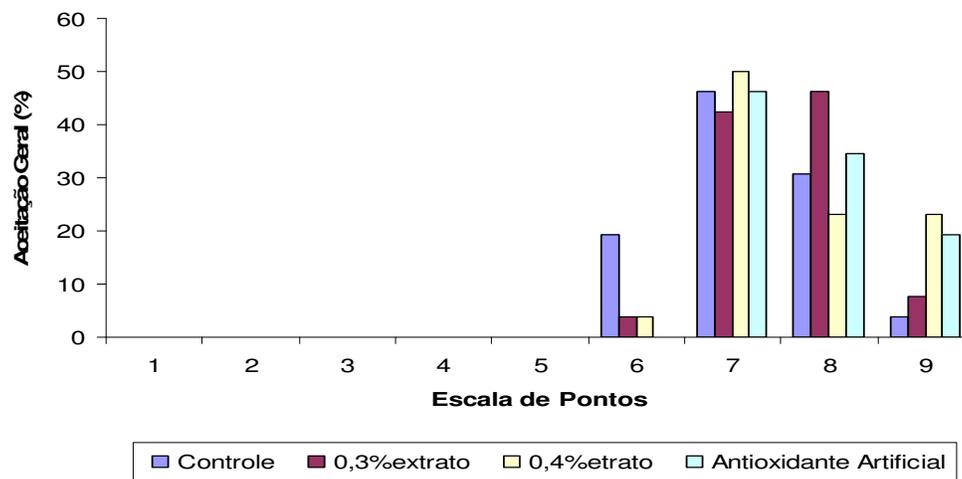
\*\* médias ± desvio padrão das pontuações dos provadores seguidas de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas linhas/colunas não diferem estatisticamente a nível de 5% (teste T)

Na avaliação dos atributos sabor e textura, pode-se observar (Tabela 15) que as amostras com concentrações de extrato de erva-mate obtiveram valores próximos aos dos salames que continha antioxidante artificial, o que indica que não houve interferência do extrato de erva-mate nas características globais do produto. As médias de aceitação geral no 21<sup>o</sup> dia de armazenamento das formulações controle (Tratamento 1), 0,3 % de extrato de erva-mate (Tratamento 2), 0,4 % de extrato de erva-mate (Tratamento 3) e com antioxidante artificial (Tratamento 4) situaram-se entre os termos hedônicos “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”. No entanto, no 60<sup>o</sup> dia de armazenamento o tratamento com antioxidante artificial (eritorbato de sódio) e 0,4 % de extrato de erva-mate apresentaram a melhor aceitação, com uma média de 7,73 e 7,65, respectivamente, correspondendo na escala de pontuações dos provadores ao “gostei moderadamente”. Estes resultados demonstram que a adição de 0,3 e 0,4 % de extrato de erva-mate na formulação do salame tipo italiano não alterou a

aceitabilidade sensorial do produto. Sendo que os índices de aceitação geral, no 21º dia de armazenamento foram de 75,2, 77,8, 82,2 e 80,3 % para os tratamentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.



(a)



(b)

**Figura 19** - Histograma de frequência para Aceitação geral aos 21 (a) e 60 dias (b), respectivamente (9 - gostei muitíssimo, 8 - gostei muito, 7 - gostei moderadamente, 6 - gostei ligeiramente, 5 - não gostei / nem desgostei, 4 - desgostei ligeiramente, 3 - desgostei moderadamente, 2 - desgostei muito, 1 - desgostei muitíssimo).

O histograma de frequência referente ao atributo aceitação geral (Figura 20), mostra que para os tratamentos 2, 3 e 4, os salames ao 21<sup>o</sup> dia de armazenamento, apresentaram como característica "gostei muito", correspondendo a uma aceitação geral de 33,3, 30 e 30 %, respectivamente. Contudo, para todos os ensaios analisados aos 60 dias, houve um acréscimo da aceitação geral e a máxima pontuação (gostei moderadamente) foi atribuída ao Tratamento 3 (Salame com 0,4 % extrato de erva-mate), com 50 % aceitação geral. Aparecendo em seguida com 46,16 % o salame com antioxidante artificial (Tratamento 4).

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

### 5.1 Conclusões

A partir dos resultados obtidos e dos objetivos que levaram a este trabalho ser realizado, conclui-se que:

1. A atividade antioxidante *in vitro* do extrato de erva-mate a partir de folhas não sapecadas aumenta proporcionalmente a concentração de extrato adicionado atingindo 95,67 % de atividade antioxidante para a concentração 500 µg/mL permitindo-se determinar um IC<sub>50</sub> de 157,85 µg/mL.

2. As formulações de salame - Tipo Italiano resultaram num produto com valores de pH entre 4,72 e 5,01 e atividade de água entre 0,752 a 0,790. De acordo com o regulamento técnico de identidade de qualidade do salame tipo italiano, as formulações estariam dentro do permitido que é no máximo 35 % de umidade, no período de 60 dias.

3. O crescimento das bactérias lácticas foi mais expressivo no 2º dia de maturação (8,22 a 8,50 log<sub>10</sub> UFC/g ) apresentando no final da maturação valores entre 5,15 a 5,56 log<sub>10</sub> UFC/g. As concentrações testadas do extrato de erva-mate não inibiram os micro-organismos pertencentes a este grupo, não afetando assim o processo fermentativo do produto.

4. Os menores índices de cor objetiva a\* (vermelho) foram verificados aos 60 dias na formulação controle e na com 0,4 % de extrato de erva-mate, de 12,27 e 12,23. Os valores de luminosidade demonstram que a adição de extrato de erva-mate não interferiram no brilho do produto.

5. Em relação aos atributos sabor e textura, as formulações com extrato de erva-mate a aceitabilidade foi semelhante aos dos salames que continha antioxidante artificial, o que indica que não houve interferência do extrato de erva-mate nas características globais do produto.

6. Durante o armazenamento todas as formulações apresentaram diferença significativa (p<0,05) nos teores de TBARS quando comparadas ao tratamento

controle (sem adição de antioxidante), comprovando a ação antioxidante da presença de 0,4 % extrato da erva-mate no produto.

7. A presença de antioxidante influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) na oxidação de proteínas. Na formulação com adição de 0,4 % de extrato de erva-mate e na com antioxidante artificial (eritorbato de sódio) ocorreu redução da concentração de carbonil. Indicando assim que nesta concentração o extrato de erva-mate pode ter exercido ação antioxidante frente à oxidação de proteínas.

## **5.2 Sugestões para trabalhos futuros**

- Preparar o extrato de erva-mate por método de liofilização;
- Elaborar produtos cárneos com diferentes concentrações do extrato liofilizado;
- Avaliar a formação de produtos secundários da oxidação de lipídios (hexanal, etc) e de proteínas (metilbutanal, fenilaldeído, etc) por métodos cromatográficos;
- Treinamento da equipe de provadores para a análise sensorial.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AaRDT, V. **Controlled Release of Antioxidants via Biodegradable Polymer Films into Milk and Dry Milk Products**, 2003, 4-8p. Dissertação – Faculty of the Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, Virginia.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 17 ed. Washington, 2000. 1219p.

AGUIAR, A.C.; VISENTAINER, J.E.L.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Ingredientes na indústria de carnes – aspectos gerais. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n. 353, p. 18-23, 2006.

AHMAD, S.; SRIVASTAVA, P. K. Quality and shelf life evaluation of fermented suasages of buffalo meat with different levels of heart and fat. **Meat Science**, v. 75, p. 603-603, 2007.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos - Teoria e prática**. 3º ed. Viçosa: UFV, 2005. 478p.

ARÇARI, D.P. **Efeitos biológicos do consume de chá-mate (*Ilex paraguariensis*) frente à obesidade em camundongos**. 2009, p. 23-29. Dissertação (Mestre em Nutrição em saúde pública) – Universidade de São Paulo.

BACUS, J. Update: meat fermentation 1984. **Food Technology**, v. 38, n. 6, p. 59-69, 1984.

BELEDELLI, B.D. **Elaboração de salame tipo italiano adicionado de selênio**. 2009, 20 -35p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus de Erechim.

BERNARDI, S.; OETTERER, M.; CASTILHOS, C.J.C. Embutidos Cárneos. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n.378, p.30-37, 2008.

BIASI, V.; BORTOLINI, F.; PIANOVSKI, P.B.; HUBER, E. Estudo do efeito da cultura starter sobre a microbiota da carne durante a fabricação de salame tipo italiano. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n.361, p.114-123, 2007.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. V.72, 248-254, 1976.

BRASIL. Instrução normativa n. 22, de 31 de julho de 2000. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de salame tipo italiano. Publicado no Diário Oficial da União de 3/08/2000.

BRASIL, Secretária de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998, republicada no Diário Oficial da União de 22 de março de 1999. Aprova Regulamento Técnico: "**Atribuição de função de aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 – carne e produtos cárneos**". Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos>. Acesso em: 30 de agosto de 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-Químicos para Análises de Alimentos**, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, Ministério da Saúde, 1018p., 2005.

BUCKENHÜSKES, H.J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as cultures for various food commodities. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, p.253-272, 1993.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. - The quantitative analysis of phenolic constituents. **Lebensmittel Wissenschaft und Technology**, Oxford, v.28, p.25-30, 1995.

BRANEN, L.A.; DAVIDSON, P.M. **Antimicrobials in Foods**. New York: Marcel Dekker. 1983. 465p.

CAMPAGNOL, P.C.; FRIES, L.L.M.; TERRA, N. Salames: da seleção da matéria-prima à qualidade microbiológica. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n.362, p.36-41, 2007.

CHAGAS, S.S. **Redução do tempo de fabricação do salame Tipo italiano**. Santa Maria. 1998. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria.

CAMPOS, R.M.J.; HIERRO, E.; ORDOÑEZ, 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.103p. 1159 – 1167, 2007.

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

CARBONARI, K.A. **Avaliação do Potencial Antioxidante (*In vitro* e *In vivo*) e Antiinflamatório de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura***. Florianópolis. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Saúde) - Universidade Federal de Santa Catarina.108p, 2005.

CARIONI, F. O.; PORTO, A. C. S.; PADILHA, J. C. F.; SANT'ANNA, E. S. Uso de culturas iniciadoras para a elaboração de um embutido à base carne de pato

(*Cairina moschata*) **Ciência de Tecnologia de Alimentos**, v.21, 337p. Campinas, 2001.

CHANDRA, S.; MEJIA, E.G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Reductase Activity of Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural Food Chemistry**; v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CIROLINI, A. ***Staphylococcus Xylosus e Lactococcus Lactis SSP Lactis Nativos utilizados na elaboração de salame tipo italiano***. Dissertação (Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, 83p, 2008.

CICHOSKI, A. J.; TERRA, N. N.; FREITAS, R. S. Teoria dos obstáculos (*hurdle technology*) em produtos cárneos curados. **Higiene Alimentar**, v. 18, p. 33-36, 2004.

CICHOSKI, A.; ZIS, L.C.; FRANCESCHETTO, C. Características físico-químicas e microbiológicas da superfície do salame tipo italiano contendo solução de lactato de potássio. **Ciência de Tecnologia de Alimentos**, v.29, 548p. Campinas, 2009.

COMI, G.; URSO, R.; IACUMIN, L; RANTSIOU, K.; CATTANEO, O.; CANTONI, C.; COCOLIN, L. Characterization of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. **Meat Science**, v.69, p. 381-392, 2005.

DALLA SANTA, O. R. **Avaliação da qualidade de salames artesanais e seleção de culturas starter para a produção de salame tipo italiano**. Curitiba, 2008. 7 – 22p. Tese (Doutorado) – Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

DEGENHARDT, R. **Sobrevivência de *Listeria Monocytogenes* em salame tipo italiano de baixa acidez produzido sob condições brasileiras de fabricação.** 2006. p. 2–11. Dissertação ( Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

EKLUND, P.C; LANGVIK, O.K; WÄRNA J.P., SALMI T.O., WILLFÖR, S.M. e SJÖHOLM R.E. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 3336-3347, 2005.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E.; EEROLA, S.; LILLEBERG, L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SUIHKO, M.L. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. **Meat Science**, v. 58, N. 2, p. 111-116, 2001b.

FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de análise sensorial.** Campinas: ITAL/LAFISE, p.116, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LADGRAF, M. **Microbiologia de alimentos.** São Paulo: Atheneu, 1996. 144p.

FERREIRA, V. L. P.; FERNANDES, S. V.; YOTSUYANAGI, K. The color of chicken and pork meat loaf with added cured bovine blood as evaluated by the Rab, Hunter Lab, L\*, a\* and X Y Z CIE systems. **Revista Española de Ciencia e Tecnología de alimentos**, v. 34, n. 3, p. 311-12, 1994.

GAIO, I. **Atividade antimicrobiana e antioxidante *in vitro* e em salame tipo italiano do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.),** 2008. 141p. Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Erechim, RS.

GALLI, F. Os embutidos: como fabricá-los. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n.194, p.14-27, Agosto, 1993.

GARCIA, F.T.; GAGLEAZZI, U.A. Variação das Propriedades Físicas e Químicas do Salame tipo Italiano durante Secagem e fermentação. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p.151-158, 2000.

GARCIA, E.R.G.; YOSSEF, E.Y.; OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Antioxidantes utilizados na indústria cárnea. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n. 299, p.36-49, 2002.

GEISEN, R.; FRIEDRICH, L. K.; KROCKEL, L. Starter and protective cultures for meat and meat products. **Fleischwirtschaft**, v.72, p. 894-898, 1992.

GIRAUD, E. **Contribution a l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de Lactobacillus plantarum amylolytique esolée du mandioc fermenté**. Marseille, 1992. 139 f. Thèse. Université de Provence aix-Marseille.

GIRARD, J.P. **Tecnología de la carne y de los productos cárnicos**. p.135, Ed. Acribia, Espanha, 1991.

GUGLIUCCI, A.; STAHL A.J. Low density Lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 35, n. 1, p. 47-56, 1995.

GRAY, J.L.; GOMAA, E.A.; BUCKLEY, D.J. Oxidative quality and shelf life of meats. **Meat Science**, v.43, p.S111-S113, 1996.

GRAU, A.; GUARDIOLA, F.; BOATELLA, J.; BARROETA, A.; CODONY, R. Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivate spectrophotometry, influence of various parameters. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.48, N. 4, p.1155-1159, 2000.

HECK, C.I.; MEIJA, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, v.72, p.139-149, 2007.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, p. 273–292, 2005.

HOWELL, N. K.; HERMAN, H.; LI-CHAN, E. C. Y. Elucidation of protein-lipid interactions in lysozyme – Corn oil system by fourier transform raman spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1529-1533, 2001.

JACQUES, R.A. **Caracterização química da erva mate (*Ilex paraguariensis*): Aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química**, 2005, 13p. Tese (Doutor em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

KOUTSOUMANIS, K.; TASSOU, C.C.; TAOUKIS, P.S.; NYCHAS, G. J.E. Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 981-987, 1998.

KUMAR, S.; PEDERSEN – WISMER, J.; CASPERSEN, C. Effect of raw materials deboning methods of chemical additives on microbial quality of mechanically deboned poultry meat during frozen storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 23, n.4, p. 217-220, 1986.

LEVINE, R. L.; REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 357–363, 1990.

LIZASCO, G.; CHASCO, J.; BERIAIN, M.J. Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichón, a Spanish dry cured sausage. **Food Microbiology**. V. 16, N. 3, p.219-228, 1999.

LÜCKE, F.K. Fermented meat products. **Food Research International**, v. 27, n.3, p. 299-307, 1994.

LÜCKE, F.K. Fermented sausages. In: WOOD B.J.B (Org). **Microbiology of fermented foods**. 2<sup>nd</sup> ed, London: Blackie Academy Professional, 1998, v.2, p.441-483.

LUCKE, F.K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v. 56, n. 2, p. 105-115, 2000.

MACEDO, R.E.F. **Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de produto cárneo fermentado**. Curitiba. 2005. 193f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná.

MARANGONI, C. **Atividade antioxidante do óleo essencial de coentro (*Coriandrum Sativum* L.) em salame italiano**. Dissertação (Mestrado em Química), 2007.

MARCHESI, C. M.; CICHOSKI, A. J.; ZANOELO, E. F.; DARIVA, C. Influência das condições de armazenamento sobre os pigmentos cárneos e a cor do salame italiano fatiado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 697-704, 2006.

MARTÍN, A.; COLÍN, B.; ARANDA, E.; BENITO, M.J; CÓRDOBA, M.G. Characterization of Micrococaceae isolated from Iberian dry-cured sausages. **Meat Science**, v.75, p. 696-697, 2007.

MENDES, A.C.R. Transformações bioquímicas na fração lipídica de produtos cárneos durante o armazenamento. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n. 265, p. 30-36, 1999.

MELO, E.A; FILHO, J.M.; GUERRA, N.B.; MACIEL, G.R. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência de Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 195-199, 2003.

MILANI, L.I.G. et al. Antioxidantes e antimicrobianos naturais para carne mecanicamente separada de frango. In: IV SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2001, Campinas. **Anais do IV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, 2001, p.122.

MOLIN, R.F. **Desenvolvimento de Processo Oxidativo de Folhas de Ervamate (*Ilex paraguariensis* St. Hil)**. 2009, p. 7-10. Dissertação (Mestre em Ecologia) – URI Campus de Erechim.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. Ed. Livraria Varela, São Paulo, 1998, 150p.

MOURA, N.F; MENDONÇA, L.; MARANGONI, C. **Estudo do óleo volátil da *Salvia officinalis* L. em produtos cárneos com ação antibacteriana e antioxidante**. Pesquisa universal CT&IFAPESC 03/2006. Relatório Técnico Científico, UnoChapecó, 2009.

MURTAUGH, A. M; MA, K; BENSON, J; CURTIN, K; CAAN, B; SLATTERY, M. L. Antioxidants, Carotenoids, and Risk of Rectal Cancer. **American Journal of Epidemiology**, v.159, n. 1, p. 32-41, 2004.

MÜLLER, W. D. Curing nas smoking: are they healthier processes today than used to be? **Fleischwirtschaft**, v.71, n.1, p.61-65, 1991.

OLIVEIRA, M.J.; ARAÚJO, W.M.C; BORGIO, L.A. Quantificação de nitrato e nitrito em lingüiças do tipo frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n. 4, p. 736-742, 2005.

ORDÓÑEZ, J.A; HIERRO, E.M.; BRUNA, J.M. Changes in the components of Dry – fermented sausages during ripening. **Food Science and Nutrition**, v. 9, p. 329-367, 1999.

PADILHA, A.D.G. **Antioxidante natural de erva mate na conservação da carne de frango in vivo**, 2007, 18-21p. Dissertação (Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria.

PAPAMANOLI, E.; KOTZEKIDOU, P.; TZANETAKIS, N.; LITOPLOULOUTZANETAKI, E. Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented sausage. **Food Microbiology**, v. 19, p. 441-449, 2002.

PELSER, W.M.; LINSSEN, J.P.H.; LEGGER, A.; HOUBEN, J.H. Lipid oxidation in n-3 fatty acid enriched Dutch style fermented sausages. **Meat Science**, v. 75, p. 1-11, 2007.

PEREIRA, M.G. **Aplicação de Antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de ave**, 2009, 37-61p. Dissertação (Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria.

PEREZ-ALVAREZ, J. A.; SAYES-BARBARE, M. E.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; ARANDA-CATALA, V. Physicochemical characteristics of Spanish type dry-cured sausage. **Food Research International**, v. 32, n. 9, p. 599–607, 1999.

POKORNÝ, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science and Technology**, v.2, n.9, p. 223-227, 1991.

PIECADE, K. R. **Uso de ervas aromáticas na estabilidade oxidativa de filés de sardinha (*Sardinella brasiliensis*)**. Dissertação apresentada ao Programa de

Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Piracicaba-SP, 2007.

PINTO, M. F.; PONSANO, E. H. G.; HEINEMANN, R. J. B. Bactérias envolvidas no processamento de produtos cárneos – uma revisão. **Boletim do SBCTA**, v.35, n. 1-2, p. 109 – 116, 2001.

POURCHET-CAMPOS, M.A. Perspectivas do uso de aditivos em alimentos: os antioxidantes. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n.227, p.12 -13, 1996.

PRECI, D. **Extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) em iogurte light tradicional e probiótico**. Dissertação ( Mestre em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim. 2010.

PRICE, J.F; SCHWEIGERT, B.S. **Ciencia de la Carne y de los productos carnicos**, 2º ed., Ed. Acribia, Espanha, p. 421, 1994.

RAHARJO, S.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Improved speed, specificity and limit of determination of na aqueous acid extration thiobarbituric acid-C<sub>18</sub> method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 40, 2 p. 182-2185, 1992.

RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 255-267, 2006.

RODRIGUEZ, M.; NÚÑEZ, F.; CÓRDOBA, J.J.; BERMÚDEZ, M. E. ASENSIO, M. A. Evaluation of proteolytic activity of micro-organisms isolated from dry cured ham. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.905 – 912, 1998.

ROTTA, R.B. **Estudo da atividade glutathiona peroxidase em carne de frango**, 2007, p. 4-7. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus de Erechim.

SCHEID, G.A. **Avaliação sensorial e físico-química de salame tipo italiano com diferentes concentrações de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*)**, 2000, p. 18-20. Tese (“Magister Scientiae”) – Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais.

SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P.M.; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, n. 2, p. 357-360, 2000.

SCHWERT, R. **Uso de coadjuvante de tecnologia em lingüiça tipo calabresa cozida e defumada**, 2008, p. 56-69. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus de Erechim.

SAGGIORATO, A.G. **Atividade antifúngica e antioxidante *in vitro* e na superfície de salame tipo italiano do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.)**, 2008, p. 91-121. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Campus de Erechim.

SALDANHA, L.A. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*)**. 2005, p. 20-21. Dissertação (Mestre em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública , Universidade de São Paulo.

SAMESHIMA, T.; MAGOME, C.; TAKESHITA, K.; ARIHARA, K.; ITOH, M.; KONDO, Y. Effect of intestinal Lactobacillus start cultures on the behaviour of

*Staphylococcus aureus* in fermented sausage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 1-7, 1998.

SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J.; VLASSI, M.; PAPPA, A. Stability and safety of traditional Greek salami - a microbiological ecology study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 69-82, 1998.

SANZ, Y.; FLORES, J.; TOLDRA, F.; FERIA, A. Effect of pre-ripening on microbial and chemical changes in dry fermented sausages. **Food Microbiology**, v. 14, p. 575 - 582, 1997.

SILVA, F.A. **Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de *Ilex paraguariensis* St.Hil – Aquifoliaceae (erva-mate)**, 2007, p. 9-16. Tese (Doutor em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SMITH, J.L., PALUMBO, S.A. Microorganisms as Food Additives. **Journal of Food Protection**, v. 44, p. 936-955, 1981.

SOYER, A.; ERTAS, A. H.; ÜZÜMCÜOĞLU, Ü. Effect of processing conditions on the quality of naturally fermented Turkish sausages (sucukus). **Meat Science**, v. 69, p. 135-141, 2005.

SUMMO, C.; CAPONIO, F.; PASQUALONE, A. Effect of vacuum-packaging storage on the quality level of ripened sausages. **Meat Science**, v. 74, n. 2, p. 249-254, 2006.

TARLADGIS, B.G.; PEARSON, A.M.; DUGAN, J.L.R. Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods. **Journal Science Food Agriculture**, Champaign, v. 15, n. 9, p. 602-607, 1964.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M.; BARBETTA, P. A. **Análise sensorial de alimentos**. Florianópolis: UFSC, 1987. 180p. (Série Didática).

TERRA, N. Particularidades na fabricação do salame. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n.341, p.12 -18, 13º Catálogo, 2005.

TERRA, N. Nível tecnológico da produção de embutidos cárneos fermentados no Brasil: aplicação da biotecnologia em produtos cárneos. **Centro de tecnologia de Carne/ ITAL**, p.11, 1990.

TERRA, N. N.; BRUM, A.R.M. **Carne e seus derivados**. Técnicas de Controle de Qualidade, 120p., 1998.

TERRA, N.; CICHOSKI, A.J; FREITAS, R.J.S. **Valores de nitrito e TBARS durante o processamento e armazenamento da paleta suína curada, maturada e fermentada**. Ciência Rural, Santa Maria. V.36, n.3, p.965 -970, maio-junho, 2006.

TERRA, A.B.M.; FRIES, L.L.M., TERRA, N.M.N. **Particularidades na fabricação de salame**. Livraria e Editora Varela Ltda. São Paulo, 2004, 152p.

TERRA, N.N.; FRIES, L.L.M; TERRA, A.M. Fermentação cárnea: princípios e inovações. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n.294, p.30-41, Agosto, 2001.

TRINDADE, M.A.; NUNES, T.P.; CASTILHO, C.J. .; FELICIO, P.E. Estabilidade oxidativa e microbiológica em carne de galinha mecanicamente separada e adicionada de antioxidante durante período de armazenamento a 18º C. **Ciência de Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 160-168, 2008.

VALDUGA, A.T. **Uso sustentado e processamento de *Ilex paraguariensis* St. Hill (Erva – mate)**. 2002. p. 44-48. Tese ( Ecologia e Recursos Naturais) Universidade Federal de São Carlos – São Paulo.

VARNAN, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Carne y productos cárneos: tecnología, química y microbiología**. Zaragoza: Acribia, 1998. 423p.

VIEIRA, E.N.R.; MENDONÇA, R.C.S. Embutidos fermentados e cultura starter: questão de qualidade. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n.371, p.16-25, 2005.

VILELA, A. L. M; RESCK, I. S; GRISOLI, C. K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.4, p. 956-963, 2008.

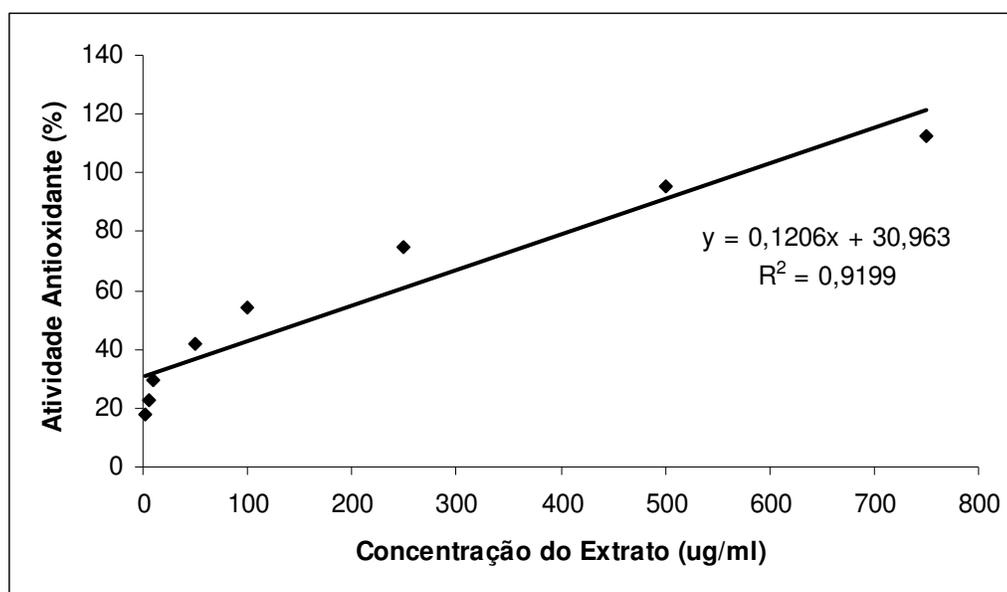
## ANEXO

### ANEXO A

**Figura 20** - Ficha de especificação do COMBISTART 1505

## APÊNDICE

## APÊNDICE A



**Figura 21** - Curva de calibração da atividade antioxidante do extrato de erva-mate óleo essencial de manjeriço (*Ilex paraguariensis*).