



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Gabriela Soster Santetti

**PÃO INTEGRAL COM ADIÇÃO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil):
QUALIDADE TECNOLÓGICA, POTENCIAL FENÓLICO E BIOACESSIBILIDADE
*IN VITRO***

Florianópolis

2022

Gabriela Soster Santetti

**PÃO INTEGRAL COM ADIÇÃO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil):
QUALIDADE TECNOLÓGICA, POTENCIAL FENÓLICO E BIOACESSIBILIDADE
*IN VITRO***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Dias de Mello Castanho Amboni

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Gutkoski

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santetti, Gabriela Soster

Pão integral com adição de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil): Qualidade tecnológica, potencial fenólico e bioacessibilidade in vitro / Gabriela Soster Santetti ; orientadora, Renata Dias de Mello Castanho Amboni, coorientador, Luiz Carlos Gutkoski, 2022.

189 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Ciência dos Alimentos. 3. Polifenóis. 4. Panificação. 5. Erva-mate . I. Dias de Mello Castanho Amboni, Renata. II. Gutkoski, Luiz Carlos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

Gabriela Soster Santetti

**PÃO INTEGRAL COM ADIÇÃO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil):
QUALIDADE TECNOLÓGICA, POTENCIAL FENÓLICO E BIOACESSIBILIDADE
*IN VITRO***

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Tatiana Emanuelli, Dr.(a)

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Prof.(a) Carlise Beddin Fritzen Freire, Dr.(a)

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof.(a) Alicia de Francisco, Dr.(a)

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de “Doutora em Ciência dos Alimentos” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Prof.(a) Itaciara Larroza Nunes, Dr.(a)

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Prof.(a) Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Dr.(a)

Orientadora

Florianópolis

2022

Dedico este trabalho aos meus pais, Tania e José pelo amor, incentivo, e por serem meu maior exemplo.

AGRADECIMENTOS

Registro aqui meus mais sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma me apoiaram no decorrer dessa jornada e contribuíram para que isso fosse realizado:

À Deus por ter me guiado e me dado a força necessária para percorrer este caminho.

À minha família, especialmente meus pais José e Tania, que permitiram através do incentivo, apoio incondicional e amor, que eu chegasse até aqui. Ao Ivair, por todo apoio, amor e incentivo todos os dias, e principalmente por acreditar em mim. Obrigada do fundo do meu coração, eu amo vocês!

À minha orientadora Prof. Dra. Renata Amboni, obrigada por tantos ensinamentos, pela oportunidade e confiança que depositou em mim. Grata por todo incentivo, paciência, dedicação, por ter acolhido minhas ideias e por ter me guiado até aqui.

Às minhas amigas de Passo Fundo, Vivian, Natália, Maria e Alessandra, obrigada por surtarem comigo, diante dos momentos mais difíceis. Sem a alegria, leveza e apoio de vocês, eu não teria chegado até aqui. Obrigada do fundo do meu coração.

Às minhas amigas da Pós-Graduação, Heloísa, Marina e Bruna, vocês foram essenciais na minha caminhada. Quando eu pensei em desistir, Deus mandou vocês para segurarem minha mão e me apoiarem até o fim. Sou imensamente grata por ter vocês na minha vida. Obrigada por tudo.

Aos meus amigos da faculdade, Vinicius e Ananda, obrigada por sempre enviarem energias positivas. Sei que mesmo à distância vocês permaneceram ao meu lado. Vocês fazem parte dessa conquista. Amo vocês.

À minha prima e irmã de coração, Aline, obrigada por estar comigo em todos os momentos da minha vida. Você sempre me apoiou, me deu força e esteve do meu lado nos momentos mais difíceis dessa caminhada. Sou grata por tudo que você já fez e ainda faz por mim. Amo você!

Ao professor Dr. Luiz Carlos Gutkoski, pessoa com grande importância na minha formação profissional, obrigada por ter sido o primeiro a me apresentar o mundo da pesquisa e dos cereais, e principalmente por ter confiado em mim desde o início da minha jornada acadêmica.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos (PPGCAL), pela oportunidade de realização do mestrado e doutorado, e pela disponibilização da infraestrutura necessária.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação por tantos ensinamentos compartilhados, funcionários e técnicos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Às colegas do Laboratório de Frutas e Hortaliças (em especial às professoras Renata e Carlise, e colegas Heloisa, Marina, Bruna e Isabel), por toda a paciência, dedicação, momentos compartilhados e o conhecimento transmitido.

À Universidade de Passo Fundo, em especial a Dra. e amiga Barbara Biduski, que esteve ao meu lado, mesmo à distância, me auxiliando no desenvolvimento do trabalho, apoiando e me ensinando muito. Obrigada de coração.

Ao Dr. Rodrigo Hoff, ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) à Profa. Dra. Mariana S. L. Ferreira e a Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), obrigada pela parceria nas análises e por todo conhecimento compartilhado.

À Biotrigo Genética-Ltda e a Inovamate pela parceria desde o início e pela doação das amostras deste estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por apoiar esta pesquisa (código 001).

À banca examinadora, por aceitarem o convite e por todo conhecimento que já me foi transmitido até o momento.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho, estiveram ao meu lado durante a minha caminhada e formação, muito obrigada!!

*Epígrafe: “Foi o tempo que dedicastes à tua rosa
que fez tua rosa tão importante”*

O Pequeno Príncipe

RESUMO

Os produtos de panificação vêm sendo utilizados como veículo para a incorporação de antioxidantes naturais. No entanto, diversas etapas do processamento dos pães podem interferir na qualidade do produto final, podendo também alterar a bioatividade dos compostos que são adicionados. A erva-mate tem sido amplamente estudada devido a sua composição química complexa e seu elevado número de compostos bioativos, principalmente os compostos fenólicos. Apesar de apresentar substâncias químicas potencialmente ativas, permitindo o seu uso industrial em diversos produtos, o seu consumo ainda é fortemente ligado a hábitos culturais, o que leva a limitações em seu uso. Nesse sentido, se faz necessário o estudo de novas formas de consumo para levar os benefícios que a planta possui para um número maior de consumidores. Com o intuito de aumentar a produção e o valor agregado deste tipo de produto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da incorporação de folhas de erva-mate em diferentes tamanhos de partícula e concentrações na farinha de trigo integral e seu impacto sobre as propriedades reológicas da massa, qualidade tecnológica de panificação, conteúdo e bioacessibilidade *in vitro* de compostos fenólicos dos pães. O capítulo 1 consiste na revisão bibliográfica sobre a erva-mate, propriedades de massa e panificação e os principais efeitos durante o processamento do pão, bem como a bioacessibilidade de compostos fenólicos. No capítulo 2 foi estudado os efeitos da incorporação da erva-mate (EM) em diferentes concentrações (1,5, 2,5 e 4,5%) e tamanhos médios de partículas (245, 415,5 e 623,9 μm) na farinha de trigo integral (FTI) avaliando seus efeitos na reologia da massa, propriedades de panificação e antioxidantes do pão. A adição de erva-mate promoveu uma possível interação dos compostos fenólicos com a rede de glúten, mas sem afetar negativamente a formação de massa. As melhores características de panificação (volume, firmeza e mastigabilidade) foram observadas nos pães elaborados com 2,5% de EM. Ainda, os compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das farinhas e pães aumentaram conforme a adição de erva-mate. No capítulo 3 foi investigado o efeito de diferentes tempos de fermentação da massa elaborada com a adição de erva-mate na farinha de trigo integral, e o seu comportamento reológico, liberação de compostos fenólicos e atividade antioxidante. O comportamento da fermentação da massa apresentou uma alteração na produção de CO_2 , e o volume da massa foi reduzido quando a EM estava presente. Por outro lado, a adição de EM na massa, juntamente com o processo de fermentação, aumentou o conteúdo fenólico livre, ligado e total, bem como a sua atividade antioxidante, sendo que a concentração de 4,5% de EM aumentou o conteúdo de fenólicos livres na massa após a fermentação. A rutina foi o composto majoritário nas massas elaboradas com EM. Os tempos de fermentação de 30 e 60 minutos aumentaram o conteúdo de fenólicos nas massas, principalmente o ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, isoquercetina e rutina. Sendo assim, o processo de fermentação da massa pode ser um fator determinante para a liberação de compostos fenólicos. O capítulo 4 expôs o estudo do perfil fenólico de farinhas, massas e pães adicionados de erva-mate na farinha de trigo integral, através de uma análise metabolômica não direcionada. Um total de 104 compostos fenólicos foram identificados, pertencentes às cinco subclasses: flavonoides (35), ácidos fenólicos (32), outros polifenóis (10), estilbenos (2) e lignana (1). O maior número de compostos fenólicos identificados foi observado nos extratos ligados (77%) quando comparado aos extratos livres (59%). Como esperado, a adição de 4,5% de EM promoveu um perfil mais abundante de compostos fenólicos nas massas e nos pães. Os principais compostos encontrados nas amostras contendo erva-mate foram o ácido 5-cafeoilquínico e o ácido cafeico. Ainda, o cozimento dos pães não afetou negativamente a abundância dos compostos fenólicos. Por fim, no capítulo 5 o efeito da adição de erva-mate (EM) no perfil fenólico, capacidade antioxidante e bioacessibilidade de compostos fenólicos dos pães utilizando uma simulação gastrointestinal *in*

in vitro foram investigados. Alguns compostos fenólicos dos pães foram bioacessíveis, como ácido clorogênico, benzoico, siríngico, *p*-cumárico e siringaldeído. Dentre as fases da digestão, a fase gástrica foi a que apresentou diferentes compostos bioacessíveis para cada amostra, como ácido ferulico para P FTI (pão integral), rutina, ácido clorogênico e *p*-cumárico para P1 e P2 (pães elaborados com 2,5 e 4,5% EM, respectivamente). A concentração de alguns compostos fenólicos reduziu significativamente na fase intestinal, devido a alcalinidade no meio e ação das enzimas pancreáticas. De fato, a adição de erva-mate contribuiu para o aumento na bioacessibilidade dos compostos fenólicos nos pães, possibilitando a inclusão de um produto natural valorizando uma planta regional. Portanto, a inclusão de EM na FTI pode melhorar a qualidade funcional e nutricional dos pães, promovendo aumento no conteúdo fenólico e mantendo a qualidade do produto final, além de se mostrar uma estratégia viável para o enriquecimento de produtos de panificação, promovendo possíveis benefícios à saúde dos consumidores e potencializando o uso de um produto regional.

Palavras-chave: Produtos de panificação, polifenóis, digestão *in vitro*, *Ilex paraguarensis*.

ABSTRACT

Bakery products have been used as a vehicle for the incorporation of natural antioxidants. However, several stages of bread-making process can interfere in the quality of the final product, and can also change the bioactivity of the compounds that are added. Yerba mate has been widely studied due to its complex chemical composition and high number of bioactive compounds, especially phenolic compounds. Despite showing potentially active chemical substances, and allowing their industrial use in several products, their consumption is still strongly liked by cultural habits, which leads to limitations in their use. In this sense, it is necessary to study new forms of consumption to take the benefits that the plant has to a greater number of consumers. In order to increase the production and the added value of this type of product, the aim of this work was to evaluate the effect of the incorporation of yerba mate leaves in different particle sizes and concentrations in whole wheat flour, and its impact on rheological properties of dough, technological quality of bread making, the composition and *in vitro* bioaccessibility of phenolic compounds in breads. Chapter 1 consisted of a literature review on yerba mate, dough and bread-making properties and the main effects during bread-making process, as well as the bioaccessibility of phenolic compounds. Chapter 2 presented the effects of the incorporation of yerba mate (YM) at different concentrations (1.5, 2.5, and 4.5%) and particle sizes (245, 415.5 and 623.9 μm) in the whole wheat flour (FTI) evaluating on dough rheological properties, antioxidant activity, and bread characteristics. The addition of yerba mate promoted a possible interaction of phenolic compounds with the gluten network, without negative effects on dough formation. Improved bread quality (volume, firmness and chewiness) was found when the YM leaves were added at 2.5%. The total amount of phenolic compounds and the antioxidant activity increased as the proportion of YM increased in both flour and bread. Chapter 3 investigated the effect of different fermentation times of the dough elaborated with the addition of yerba mate (YM) in whole wheat flour (FTI), and its rheological behavior, release of phenolic compounds and antioxidant activity was evaluated. The behavior of dough fermentation showed a change in CO_2 production, and dough volume was reduced when YM was present. On the other hand, the addition of YM in the dough together with the fermentation process, increased the free, bound and total phenolic content, as well as its antioxidant activity. The addition of 4.5% of YM showed higher content for free phenolic compounds on the dough after the fermentation. Rutin was the major compound in the dough elaborated with YM. Fermentation times of 30 and 60 minutes increased the phenolic content in the doughs, mainly caffeic acid, ferulic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, isoquercetin and rutin. Therefore, the fermentation process of dough may be a determining factor for the release of phenolic compounds. Chapter 4 presented the phenolic profile of flour, dough and bread elaborated with yerba mate in whole wheat flour, through and untargeted metabolomics analysis. A total of 104 phenolic compounds were identified, belonging to the five subclasses: flavonoids (35), phenolic acids (32), other polyphenols (10), stilbenes (2) and lignan (1). The highest number of phenolic compounds identified was observed in the bound extracts (77%) when compared to the free extracts (59%). As expected, the addition of 4.5% YM promoted a more abundant profile of phenolic compounds in dough and bread samples. The main compounds found in the samples containing yerba mate were 5-caffeoylquinic acid and caffeic acid. Still, the baking process did not adversely affect the abundance of phenolic compounds. Finally, chapter 5 investigated the effect of yerba mate addition on the phenolic profile, antioxidant capacity and phenolic bioaccessibility of bread samples using an *in vitro* gastrointestinal simulation. Some phenolic compounds in bread samples were bioaccessible, such as chlorogenic, benzoic, syringic, *p*-coumaric and syringaldehyde acid. Among the digestion phases, the gastric phase presented different bioaccessible compounds for each sample, such as ferulic acid for B WWF (whole bread), rutin, chlorogenic acid and *p*-coumaric acid for B1 and B2 (bread with 2.5 and 4.5%

YM, respectively). The concentration of some phenolic compounds was significantly reduced in the intestinal phase, due to alkalinity in the medium and the action of pancreatic enzymes. In fact, the addition of yerba mate contributed to the increase in the bioaccessibility of phenolic compounds in bread samples, allowing the inclusion of a natural product valuing a regional plant. Therefore, the inclusion of YM in WWF can improve the functional and nutritional quality of bread, promoting an increase in the phenolic content and maintaining the quality of the final product, in addition to showing a viable strategy for the enrichment of bakery products, promoting possible benefits to consumer health and enhancing the use of a regional product.

Keywords: Bakery products, polyphenols, *in vitro* digestion, *Ilex paraguarensis*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – Revisão Bibliográfica

Figura 1. Folha de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hill)	26
Figura 2. Estruturas químicas dos ácidos fenólicos hidroxibenzoicos (A) e hidroxicinâmicos (B)	27
Figura 3. Estrutura genérica das principais classes de flavonoides	28

CAPÍTULO 2 –

Efeito das folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) nas propriedades de massa, atividade antioxidante e qualidade do pão elaborado com farinha de trigo integral

Figura 1. Distribuição de tamanho de partícula da (a) farinha de trigo integral, (b) erva-mate fina, (c) erva-mate média e (d) erva-mate grossa	50
Figura 2. Fotografias dos pães elaborados com a combinação de erva-mate em diferentes tamanhos de partículas e proporções na farinha de trigo integral	60
Figura 3. (a) Conteúdo fenólico total e (b), (c), (d) atividade antioxidante das farinhas e pães elaborados com diferentes proporções e tamanhos de partículas da erva-mate na farinha de trigo integral	63

CAPÍTULO 3 –

A adição de folhas de erva-mate na massa de pão tem influência na fermentação e na disponibilidade de compostos fenólicos?

Figura 1. Conteúdo fenólico livre (a), ligado (b), e total (c) das massas elaboradas pela incorporação de erva-mate na farinha de trigo integral após os diferentes tempos de fermentação	83
Figura 2. Capacidade antioxidante das massas elaboradas pela incorporação de erva-mate na farinha de trigo integral após os diferentes tempos de fermentação	86
Figura 3. Principais compostos fenólicos identificados nas massas nos tempos de fermentação de 30, 60 e 90 minutos na FTI (a), EM1 (b) e EM2 (c)	91

CAPÍTULO 4 –

Análise do perfil fenólico em pães de trigo integral com erva-mate e os efeitos do processo de panificação através da metabolômica não-direcionada

Figura 1. Número de compostos fenólicos identificados para cada classe e amostra (A), extrato (B) e (C) a evolução durante o as etapas de panificação	112
Figura 2. Abundância relativa total de íons de classes e extratos livres e ligados (A) e a soma da abundância relativa de íons para os extratos livres e ligados das amostras de farinha, massa e pão (B)	119
Figura 3. Análise de PCA (A) e PLS (B) dos compostos identificados nas amostras. A pontuação (amostras representadas pelo símbolo) é distribuída de acordo com a abundância relativa de íons dos compostos fenólicos identificados (círculos cinzas).(C) Compostos discriminados por análise projeção de importância variável nas amostras de farinha, massa e pão	121
Figura 4. Análise de agrupamento hierárquico (HCA) e mapa de calor de compostos fenólicos livres e ligados em amostras de farinha, massa e pão preparadas com adição de erva-mate	125

CAPÍTULO 5 –

Bioacessibilidade de compostos fenólicos de pães integrais adicionados de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) durante simulação gastrointestinal *in vitro*

Figura 1. Esquema do processo de simulação gastrointestinal <i>in vitro</i>	139
Figura 2. Alteração da composição fenólica total (A) e atividade antioxidante <i>in vitro</i> (B e C) das amostras de pão durante a digestão simulada <i>in vitro</i> e amostras controle	143
Figura 3. Soma de compostos fenólicos individuais das amostras de pães durante a digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> e amostras controles.....	148
Figura 4. Análise de Componentes Principais dos compostos fenólicos individuais, polifenóis e atividade antioxidante durante as etapas de digestão <i>in vitro</i> de pães (A) P1, (B) P2 e (C) P FTI	152

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 –

Efeito das folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) nas propriedades de massa, atividade antioxidante e qualidade do pão elaborado com farinha de trigo integral

Tabela 1. Composição química da farinha de trigo integral e das folhas de erva-mate fina, média e grossa	51
Tabela 2. Delineamento experimental para a incorporação de erva-mate na farinha de trigo integral	52
Tabela 3. Propriedades de mistura das massas elaboradas pela incorporação de erva-mate na farinha de trigo integral	55
Tabela 4. Propriedades extensionais das massas elaboradas pela incorporação de erva-mate na farinha de trigo integral	57
Tabela 5. Qualidade tecnológica de panificação dos pães elaborados com a incorporação de erva-mate na farinha de trigo integral	61

CAPÍTULO 3 –

A adição de folhas de erva-mate na massa de pão tem influência na fermentação e na disponibilidade de compostos fenólicos?

Tabela 1. Efeito das folhas de erva-mate na massa de pão analisada pelo reofermentômetro F4	80
Tabela 2. Perfil fenólico das massas de pães elaborados com a adição de erva-mate na farinha de trigo integral após diferentes tempos de fermentação	89
Tabela 3. Perfil fenólico das folhas de erva-mate	93

CAPÍTULO 4 –

Análise do perfil fenólico em pães de trigo integral com erva-mate e os efeitos do processo de panificação através da metabolômica não-direcionada

Tabela 1. Compostos fenólicos livres, ligados e totais das amostras de massa e pão elaboradas com a adição de erva-mate109

Tabela 2. Compostos fenólicos livres e ligados mais abundantes identificados nas amostras de farinha, massa e pão com adição de erva-mate116

CAPÍTULO 5 –

Bioacessibilidade de compostos fenólicos de pães integrais adicionados de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) durante simulação gastrointestinal *in vitro*

Tabela 1. Composição fenólica individual dos pães durante a simulação gastrointestinal *in vitro*146

Tabela 2. Índice de bioacessibilidade de compostos fenólicos após o processo de digestão *in vitro* dos pães150

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVOS	23
1.1.1 Objetivo geral	23
1.1.2 Objetivos específicos	23
CAPÍTULO 1	24
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
1.1 Erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil)	25
1.2 Utilização de matérias-primas alternativas como fonte de fibras e antioxidantes naturais em panificação	29
1.3 Propriedades de massa e panificação	30
1.4 Efeito do processamento do pão na composição fenólica	33
1.5 Bioacessibilidade dos compostos fenólicos em modelos de digestão simulada <i>in vitro</i>	34
REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 2	44
1. INTRODUÇÃO	47
2. MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1 Material	49
2.2 Preparação da farinha de trigo integral e das folhas de erva-mate	49
2.3 Delineamento experimental	51
2.4 Composição química da matéria-prima	52
2.5 Propriedades de mistura e extensionais da massa	52
2.6 Processamento e qualidade do pão	53
2.7 Análises químicas	53
2.8 Análises estatísticas	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1 Efeito das folhas de erva-mate nas propriedades de mistura da massa	55
3.2 Efeito das folhas de erva-mate nas propriedades extensionais da massa	57
3.3 Qualidade dos pães enriquecidos com as folhas de erva-mate	59
3.4 Conteúdo fenólico total e atividade antioxidante dos pães e farinhas elaborados com erva-mate	62
4. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66
CAPÍTULO 3	70
1. INTRODUÇÃO	73

2. MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1 Material	75
2.2 Processamento da farinha de trigo integral e das folhas de erva-mate	75
2.3 Comportamento da massa durante a fermentação	76
2.4 Elaboração da massa em diferentes tempos de fermentação	76
2.4.1 Extração e determinação de compostos fenólicos livres e ligados das massas após diferentes tempos de fermentação	77
2.4.2 Capacidade antioxidante das massas após diferentes tempos de fermentação	78
2.4.3 Análise LC-MS/MS do perfil fenólico da erva-mate e das massas após diferentes tempos de fermentação	78
2.5 Análise estatística	79
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
3.1 Comportamento fermentativo da massa elaborada com folhas de erva-mate.....	79
3.2 Compostos fenólicos livres, ligados e totais das massas elaboradas com erva-mate após os diferentes tempos de fermentação	82
3.3 Efeito de diferentes tempos de fermentação nas propriedades antioxidantes das massas	85
3.4 Perfil fenólico das massas elaboradas com erva-mate nos diferentes tempos de fermentação.....	87
4. CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS	96
CAPÍTULO 4	100
1. INTRODUÇÃO	103
2. MATERIAL E MÉTODOS	105
2.1 Materiais e químicos	105
2.2 Farinha de trigo integral, folhas de erva-mate e preparação dos pães	105
2.3 Extração dos compostos fenólicos livres e ligados.....	106
2.4 Conteúdo fenólico.....	106
2.5 Determinação do perfil fenólico por UPLC-MS ^E	107
2.6 Processamento dos dados.....	107
2.7 Análise estatística	108
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
3.1 Conteúdo de fenólicos da farinha, massa e pão	108
3.2 Perfil fenólico durante o processamento do pão determinado por UPLC-MS ^E	111
3.3 Análises multivariadas para discriminação do perfil fenólico nas amostras de farinha, massa e pão	120
4 CONCLUSÃO	127

REFERÊNCIAS	128
CAPÍTULO 5	132
1. INTRODUÇÃO	135
2. MATERIAL E MÉTODOS	137
2.1 Material	137
2.2 Preparação da farinha de trigo integral, folhas de erva-mate e amostras de pão	137
2.3 Simulação <i>in vitro</i> da digestão gastrointestinal de pães	138
2.4 Bioacessibilidade de compostos fenólicos	141
2.5 Atividade antioxidante dos pães durante a digestão <i>in vitro</i>	141
2.6 Análises LC-MS/MS de compostos fenólicos individuais de amostras de pães digeridas e controles	141
2.7 Análise estatística	142
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	142
3.1 Efeito da digestão <i>in vitro</i> na atividade antioxidante de pães	142
3.2 Mudanças nas concentrações de compostos fenólicos individuais durante a digestão <i>in vitro</i> de pães	145
3.3 Análise de Componentes Principais (ACP)	152
4. CONCLUSÕES	155
REFERÊNCIAS	157
CONSIDERAÇÕES FINAIS	160
APÊNDICES	162
APÊNDICE A – Material referente ao artigo do capítulo 2	162
APÊNDICE B - Material referente ao artigo do capítulo 3	164
APÊNDICE C – Material referente ao artigo do capítulo 4	168
APÊNDICE D - Material referente ao artigo do capítulo 5	181
ANEXOS	184
ANEXO A – Primeira página do artigo referente ao capítulo 2 publicado na revista <i>Journal of Food Science</i>	184
ANEXO B – Primeira página do artigo referente ao capítulo 3 publicado na revista <i>LWT-Food Science and Technology</i>	185
ANEXO C – Primeira página do artigo referente ao capítulo 4 publicado na revista <i>Food Research International</i>	186
ANEXO D – Trabalhos apresentados em eventos	187

INTRODUÇÃO

Os grãos integrais ganharam maior espaço na dieta humana, devido a possibilidade de ingestão de alimentos ricos em fibras e compostos bioativos. A substituição da farinha de trigo refinada por farinha de trigo integral na formulação de pães pode ser uma alternativa para melhorar a qualidade nutricional destes produtos. Embora seja conhecido que a farinha integral altera as propriedades tecnológicas e sensoriais dos produtos de panificação podendo levar a alterações na qualidade dos pães, como a diminuição do volume do e o aumento na firmeza (HEINIÖ *et al.*, 2016), a utilização da farinha integral, bem como o enriquecimento de produtos de panificação com fonte naturais de antioxidantes têm sido foco de diversos estudos (BENÍTEZ *et al.*, 2018).

A *Ilex paraguariensis* St. Hil (erva-mate) é amplamente produzida e consumida no sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. As propriedades farmacológicas que são atribuídas à erva-mate possuem relação com o seu alto teor de compostos bioativos, tais como ácidos fenólicos, metilxantinas, terpenos, flavonoides, saponinas, entre outros (BRACESCO *et al.*, 2018; MATEOS *et al.*, 2018; BUTIUK *et al.*, 2021). Apesar de apresentar substâncias químicas com elevada bioatividade, o seu consumo ainda é fortemente ligado a hábitos culturais, o que acarreta em limitações em sua utilização. Nesse contexto, o estudo de novas formas de consumo, que ultrapassem a barreira da tradição, possibilita levar os benefícios que a planta possui para um número maior de consumidores por meio da elaboração de diversos produtos alimentícios.

A pesquisa por antioxidantes naturais é uma tendência no mercado de alimentos, uma vez, que além de atuar na manutenção das propriedades sensoriais e químicas dos produtos, também estão associados à manutenção da saúde e prevenção de doenças (DHEN *et al.*, 2018). À vista disto, os produtos de panificação revelam-se como um bom veículo para incorporação destes ingredientes potencialmente ativos (NING *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2017; OU *et al.*, 2019), e por isso, a elaboração de pães de forma utilizando a farinha de trigo integral e a erva-mate como ingrediente funcional se apresenta como uma alternativa para o desenvolvimento de um produto com características nutricionais e funcionais melhoradas. Gawlik-Dziki *et al.* (2015) e Wang *et al.* (2015) relataram que o enriquecimento de pães de forma com diferentes fontes naturais de compostos fenólicos pode favorecer a formação da massa, melhorar a qualidade nutricional, além de aumentar a vida útil do produto.

Embora a adição de compostos fenólicos se apresente como uma alternativa promissora para a elaboração de produtos de panificação, vale ressaltar que o potencial antioxidante é

dependente das condições de processamento. O processo de fermentação e cocção são os principais responsáveis pela ausência ou presença da capacidade antioxidante no produto final, uma vez que os compostos fenólicos possuem baixa estabilidade e podem degradar quando são submetidos à altas temperaturas (GERM *et al.*, 2019).

Em contrapartida, estudos apontam que durante o processo de fermentação alguns compostos podem ser formados e/ou liberados, aumentando o teor de compostos fenólicos no produto final (VERARDO *et al.*, 2018; SANTETTI *et al.*, 2021). Ainda, após o cozimento do pão, a atividade antioxidante pode ser aumentada, devido a interações entre os componentes da massa e os compostos fenólicos (LU *et al.*, 2017), bem como através de reações químicas que ocorrem durante o cozimento (DAVIES-HOES *et al.*, 2017; TIAN *et al.*, 2021). Nesse sentido, o processo de panificação pode elevar ou diminuir os teores dos compostos fenólicos, bem como modificar a sua biodisponibilidade, acarretando em mudanças nos benefícios à saúde dos consumidores (BENÍTEZ *et al.*, 2018; TIAN *et al.*, 2021).

As propriedades biológicas dos compostos dependem da sua liberação da matriz alimentar durante o processo de digestão, que, por sua vez, são demonstrados como grandes interferentes sob a biodisponibilidade dos compostos no organismo. Por isso, é necessário avaliar a bioacessibilidade por meio de modelos de digestão *in vitro*, que são capazes de fornecer informações sobre o comportamento nas principais etapas da digestão gastrointestinal e assim demonstrar o seu real potencial *in vivo* quando ingeridos (KETNAWA *et al.*, 2021). A bioacessibilidade dos compostos fenólicos da erva-mate presentes no pão de forma integral após a digestão gastrointestinal *in vitro* ainda não foi investigada.

A fim de abordar todos os aspectos supracitados, este trabalho está estruturado em capítulos, sendo o primeiro referente à revisão bibliográfica e os demais referentes aos resultados da pesquisa experimental, os quais foram elaborados no formato de artigos científicos.

No Capítulo 1, de revisão bibliográfica, são abordados os principais temas envolvidos no desenvolvimento do trabalho: erva-mate; utilização de matérias-primas alternativas como fonte de fibras e antioxidantes naturais em panificação; propriedades de massa e panificação; efeito do processamento do pão na composição fenólica; e, bioacessibilidade dos compostos fenólicos em modelos de digestão simulada *in vitro*.

O Capítulo 2 apresenta o estudo do desenvolvimento de um pão elaborado com diferentes proporções e tamanhos de partículas de erva-mate. Neste estudo, as variáveis de tamanho de partícula e proporções foram analisadas para determinar o tratamento que apresenta as melhores propriedades de massa e qualidade de panificação. Além disso, o conteúdo fenólico e a

atividade antioxidante foram avaliados a fim de verificar a estabilidade dos compostos durante o processamento do pão.

O Capítulo 3 apresenta o estudo do processo fermentativo do pão elaborado com as folhas de erva-mate. Neste estudo, utilizou-se os tratamentos que apresentaram as melhores características de qualidade tecnológica de panificação obtidas no capítulo 2. Foi realizado um estudo com diferentes tempos de fermentação para avaliar a interferência da erva-mate durante o processo, bem como a liberação e disponibilidade de novos compostos fenólicos que são gerados durante essa etapa.

O Capítulo 4 apresenta o estudo referente a caracterização do perfil fenólico de amostras de farinha, massa e pão elaborados com erva-mate. Neste estudo, utilizou-se as amostras que apresentaram as melhores características de massa e panificação obtidas no capítulo 2, sendo utilizada dois tamanhos de partículas e proporções. Ferramentas metabolômicas com abordagem não direcionada para caracterizar o perfil fenólico de farinhas, massas e pães elaborados com erva-mate durante o processo de panificação foram utilizadas.

O Capítulo 5 apresenta o estudo referente a bioacessibilidade de compostos fenólicos durante a simulação gastrointestinal *in vitro*. Foi realizado o estudo em pães integrais com adição de erva-mate em 2 proporções. As amostras de pães foram submetidas a digestão *in vitro* e avaliadas quanto ao seu perfil fenólico, capacidade antioxidante e bioacessibilidade após a simulação gastrointestinal.

Os artigos publicados em revista indexada (Anexo A, B e C) e os demais comprovantes dos trabalhos parciais publicados em eventos científicos da área de Ciência dos Alimentos (Anexo D) estão apresentados em anexo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da incorporação de diferentes proporções de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) em diferentes tamanhos de partícula na farinha de trigo integral e seu impacto sobre as propriedades reológicas da massa, qualidade tecnológica de panificação, potencial fenólico e bioacessibilidade *in vitro* de pães.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar as matérias-primas (farinha de trigo integral e folhas de erva-mate) em relação às propriedades físico-químicas.
- b) Elaborar os tratamentos (mistura de farinha e erva-mate em diferentes tamanhos de partículas e proporções) a partir do delineamento experimental em arranjo fatorial completo 3x3.
- c) Avaliar os tratamentos em relação as propriedades reológicas da massa e propriedades químicas (compostos fenólicos e atividade antioxidante).
- d) Elaborar pães de forma a partir dos tratamentos e avaliar as características tecnológicas de panificação e propriedades químicas (compostos fenólicos e atividade antioxidante).
- e) Selecionar os melhores tratamentos a partir de delineamento experimental.
- f) Realizar um estudo de fermentação da massa dos tratamentos selecionados, avaliando a formação e/ou liberação de novos compostos fenólicos e suas possíveis influências na massa durante o processo fermentativo.
- g) Realizar um estudo da caracterização do perfil fenólico de farinhas, massas e pães (tratamentos selecionados) com e sem incorporação de erva-mate, utilizando ferramentas metabolômicas com abordagem não-direcionada.
- h) Avaliar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos dos pães por meio da digestão simulada *in vitro*.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

Pertencente ao grupo dos produtos não madeireiros de extrativismo vegetal, a erva-mate pode ser cultivada por meio da coleta de plantas provenientes exclusivamente da regeneração natural conduzidas sob a sombra de espécies arbóreas nativas (erva-mate nativa), ou pode ser produzida em plantio ou sistemas agroflorestais, representando uma forma ambientalmente sustentável de geração de renda (RICCIO, 2019). Segundo o IBGE (2020), a produção de erva-mate no ano de 2020 alcançou 426,0 mil toneladas, obtendo um aumento na produção de 38,8% em relação a 2019, gerando assim um valor de R\$ 559,7 milhões de renda. Sendo que é no estado do Paraná onde se encontram as 10 municipalidades que obtiveram a maior produção de erva-mate em 2020.

Nos países como Brasil, Argentina e Paraguai a exploração de erva-mate com finalidade comercial, difundida desde o século XIX, representa uma grande importância socioeconômica, uma vez que essa produção é realizada por um grande número de pequenos produtores, comunidades indígenas e por ervateiras. A produção mundial de erva-mate está concentrada nesses três países, sendo que 80% da área de distribuição encontra-se no território brasileiro (RIGO *et al.*, 2014). Ainda, a erva-mate é uma das espécies que sofre pouco com as oscilações climáticas quando comparada aos demais cultivos agrícolas, proporcionando, assim, grande relevância para a fixação do homem ao campo (SANTOS *et al.*, 2003).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) (Figura 1) é uma espécie arbórea da família Aquifoliaceae, originária das regiões subtropicais da América do Sul. Ela é consumida por grande parte da população desses países, apresentando importância econômica, social e cultural (BRACESCO *et al.*, 2011; COLPO *et al.*, 2016). As formas mais comuns de consumo da erva-mate são através de bebidas tradicionais, como o chimarrão, o tererê e o chá mate (DA SILVEIRA *et al.*, 2016; BRACESCO 2019). Além da infusão das folhas de erva-mate, ela pode ser encontrada em produtos derivados de *Ilex paraguariensis* na forma de outras bebidas energéticas (GOMES *et al.*, 2012).

Figura 1. Folha de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill)



Fonte: Heck e Mejia (2007).

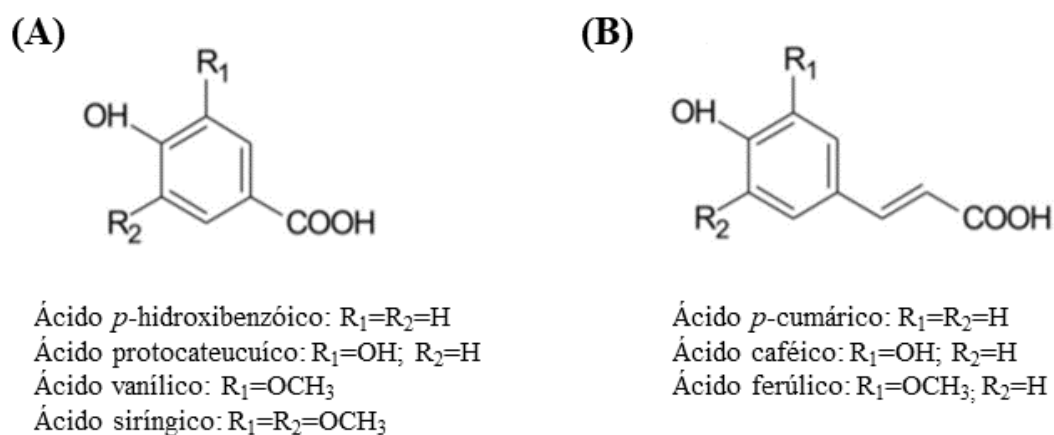
A erva-mate tem sido amplamente estudada devido a sua composição química complexa e seu elevado número de compostos bioativos. Os compostos bioativos presentes na erva-mate são os compostos fenólicos, as metilxantinas (principalmente cafeína e teobromina), flavonoides (quercetina, rutina e kaempferol) e as saponinas (BRACESCO *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2016; BAEZA *et al.*, 2018; MATEOS *et al.*, 2018, SANTETTI *et al.*, 2021). Além disso, outros constituintes como os minerais e micronutrientes também são encontrados na planta e possuem relevante importância na dieta (JUNIOR; MORAND, 2016).

A folha é considerada a parte da planta mais utilizada para o consumo humano, uma vez que possui compostos com efeitos biológicos comprovados, além de ser também a parte mais estudada por pesquisadores. Diversos estudos têm demonstrado as diferentes propriedades benéficas que a erva-mate promove para a saúde. Essas propriedades estão relacionadas a sua atividade antioxidante (BOAVENTURA *et al.*, 2013; VARGAS *et al.*, 2021), neuroprotetora e anti-inflamatória (CITTADINI *et al.*, 2015; PETRILLI *et al.*, 2016), termogênica e hipoglicemiante (RIACHI; MARIA, 2017), e antimutagênica (BRACESCO *et al.*, 2018).

Os compostos fenólicos são os constituintes mais abundantes e mais estudados na erva-mate. Pertencem a uma classe de substâncias químicas que podem ser compostas de estruturas simples, que são os ácidos fenólicos, e complexas como os taninos, e que são derivadas dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, possuindo então, em sua estrutura pelo menos um anel aromático com um ou mais grupamentos hidroxilas (ALARA *et al.*, 2021). Possuem grande importância na defesa a radicais livres produzidos, normalmente, pelo metabolismo das células ou em resposta a fatores externos, destacando-se sua ação antioxidante (RIACHI *et al.*, 2018).

Devido a estrutura ser composta por anéis aromáticos ligados a um ou mais grupos hidroxilas, os compostos fenólicos são subdivididos em grupos pelo número de anéis. O primeiro grupo é dos ácidos fenólicos (Figura 2), possuindo as subclasses derivadas do ácido hidroxibenzoico, como o ácido vanílico, e derivados do ácido hidroxicinâmico, como o ácido cafeico, *p*-cumárico e ferúlico, que por sua vez, são os mais comuns nas plantas. Sabe-se que na erva-mate estão presentes, principalmente na forma de ácidos fenólicos, o ácido cafeico, o ácido clorogênico e seus isômeros cafeoilquínicos, aos quais é atribuída a ação adstringente e antioxidante do produto, e na forma de flavonoides como a rutina, quercetina e taninos (MATEOS *et al.*, 2018; SANTETTI *et al.*, 2021). A erva-mate possui elevada concentração de compostos do grupo dos ácidos hidroxicinâmicos, em destaque o ácido cafeico e seus derivados: ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5- dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico (RIACHI *et al.*, 2017).

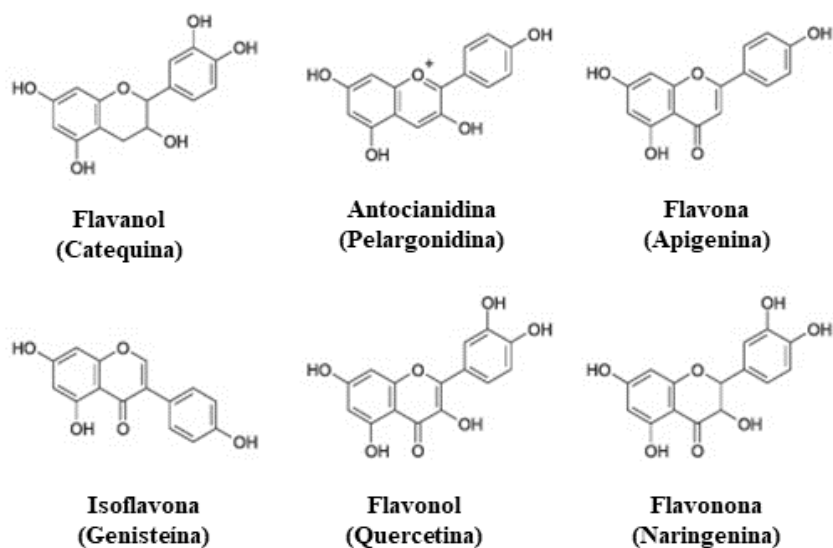
Figura 2. Estruturas químicas dos ácidos fenólicos hidroxibenzoicos (A) e hidroxicinâmicos (B)



Fonte: Adaptado de Vieira (2015).

O segundo grupo é o dos flavonoides, sendo o de maior ocorrência entre os compostos fenólicos, pois estão presentes nas plantas e são conhecidos por se acumularem em todas as partes do vegetal, como raízes, caule, folhas, flores e frutos (ALARA *et al.*, 2021). Este grupo de compostos fenólicos incluem os flavonóis, as flavonas, as isoflavonas, as flavononas, as antocianidinas e flavanois (Figura 3).

Figura 3. Estrutura genérica das principais classes de flavonoides.



Fonte: Adaptado de Ren *et al.* (2020).

Os flavonóides são antioxidantes efetivos devido a suas propriedades sequestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos, protegendo assim os tecidos dos radicais livres e da peroxidação lipídica (REN *et al.*, 2020). Desta forma, os antioxidantes naturais presentes na erva-mate têm sido alvo de pesquisas para a substituição dos antioxidantes sintéticos nas indústrias alimentícias (SORDINI *et al.*, 2019). Diversos estudos têm demonstrado a possibilidade do desenvolvimento de novos produtos alimentares à base de folhas de erva-mate, e em alguns casos, a partir de subprodutos do seu beneficiamento, o que representa alternativas de agregar valor ao produto final (FERRARIO *et al.*, 2018).

Vieira *et al.* (2008) produziram balas de goma elaboradas com o pó de erva-mate, e verificaram elevado teor de polifenóis, fibras, metilxantinas e minerais, além de alta capacidade antioxidante. Ainda, testes sensoriais indicaram que as balas de erva-mate obtiveram boa aceitabilidade pelos consumidores. Berté *et al.* (2011) adicionaram extrato aquoso de erva-mate em diferentes formulações de gelatina e observaram que os compostos bioativos da erva-mate se mantiveram estáveis no produto final. Chiesa e colaboradores (2012) obtiveram resultados satisfatórios quando incorporaram folhas de erva-mate em barras de cereal, demonstrando a viabilidade da utilização da erva-mate neste produto.

Adicionalmente, Faccin *et al.* (2015) elaboraram pães com extrato de erva-mate, utilizando como veículo de incorporação a farinha de trigo refinada. Os extratos foram elaborados com proporções diferentes de folhas (75 g e 150 g de extrato). Os resultados

indicaram que os pães apresentaram boa aceitação pelo consumidor e maior vida útil em relação a amostra controle (sem adição), devido a ação antifúngica da erva-mate.

Zanchet e colaboradores (2016) desenvolveram uma barra de chocolate branco com extrato de erva-mate e observaram que o produto apresentou boa aceitabilidade pelos consumidores e que a aplicação do extrato de erva-mate aumentou o teor de compostos fenólicos no chocolate branco. Ferrario *et al.* (2018) adicionaram o extrato de erva-mate para a elaboração de um suco de laranja visando o enriquecimento dessa bebida com os polifenóis da planta, e verificaram que mesmo com o processamento, a bebida apresentou elevado teor de compostos fenólicos e boa aceitação sensorial por parte dos consumidores. Ainda, Pluta-Kubica *et al.* (2020) desenvolveram um filme comestível a base de extrato de erva-mate para queijo coalho fresco, e observaram que a embalagem ativa prolongou a vida útil do queijo, devido à presença dos compostos fenólicos da erva-mate.

Embora existam estudos relacionados à adição de erva-mate em diversas matrizes alimentares, a busca por alternativas de uso e aplicação industrial dessa matéria-prima por meio do desenvolvimento de novos produtos visando à valorização dessa cultura e a ampliação de seu mercado pela diversificação dos produtos oferecidos, deve ser ainda explorada. Vale ressaltar que diversos estudos relatam que a presença dos compostos fenólicos pode ser influenciada de forma significativa pelas características da matriz, bem como em relação a sua proporção e o tamanho de partícula em que são incorporadas nos produtos (DA SILVEIRA *et al.*, 2016; DA SILVEIRA *et al.*, 2017).

1.2 Utilização de matérias-primas alternativas como fonte de fibras e antioxidantes naturais em panificação

Os consumidores estão cada vez mais preferindo alimentos que forneçam benefícios à saúde. Nesse sentido, a utilização de cereais integrais, bem como o enriquecimento de pães com diversas fontes naturais de fibras e antioxidantes está aumentando por parte dos consumidores (BENÍTEZ *et al.*, 2018) em relação aos produtos refinados, que por muito tempo foram os preferidos por apresentarem melhores características tecnológicas e sensoriais.

Nesse contexto, pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos produtos com a adição de fibras e antioxidantes naturais em pães têm sido recomendadas por diversos autores (DZIKI *et al.*, 2014; BENÍTEZ *et al.*, 2018; ĐUROVIĆ *et al.*, 2020). Sabe-se que os nutrientes necessários para uma dieta saudável estão concentrados principalmente nas partes externas do grão de trigo, ou seja, na farinha de trigo integral (BRESSIANI *et al.*, 2017). A utilização de

grãos inteiros de trigo para a produção de farinha integral através da moagem a seco ocorre sem que haja a separação das frações farinha, farelo fino e farelo, ou seja, o grão de trigo é moído como um todo, envolvendo todos os componentes anatômicos do grão (JONES *et al.*, 2015).

Inicialmente, os efeitos benéficos dos grãos integrais eram atribuídos ao seu alto teor de fibras, por outro lado, pesquisas indicam que o efeito benéfico pode surgir da ação combinada de vários componentes, tais como vitaminas, compostos fenólicos e outros fitoquímicos (TIAN *et al.*, 2019; CAPPELLI *et al.*, 2021). Os compostos fenólicos do grão de trigo integral podem estar presentes nas formas livre ou ligada, sendo a forma ligada encontrada com maior abundância (SANTOS *et al.*, 2019). Dziki e colaboradores (2014) realizaram um estudo em que apontaram as tendências na melhoria da atividade antioxidante de pães de farinha de trigo com adição de produtos ricos em compostos bioativos, como a utilização de outros cereais, especiarias, ervas, frutas e resíduos da indústria alimentícia.

Nos últimos anos algumas pesquisas foram realizadas visando a incorporação de vegetais, como folhas e ervas, na elaboração de produtos de panificação, como por exemplo adição de folhas de quinoa em pães (SWIECA *et al.*, 2014), biscoitos elaborados com a adição de folhas de chá verde (MICHALOWSKA-GRAMZA *et al.*, 2016), pão de forma enriquecido com folhas de café verde (SWIECA *et al.*, 2017). Todos estes estudos foram realizados com produtos à base de farinhas de trigo refinadas. No entanto, a adição desses ingredientes, considerados funcionais, ainda não está completamente elucidada quando o veículo utilizado para a incorporação é a farinha de trigo integral (DZIKI *et al.*, 2014; NING *et al.*, 2017).

Nesta perspectiva, o desenvolvimento de tecnologias de processamento de grãos integrais, bem como a adição de outros ingredientes funcionais, como as folhas de erva-mate, a fim de obter produtos mais atraentes para o consumidor se faz necessário, pois alguns estudos demonstram que as fibras, juntamente com os compostos fenólicos podem interagir e interferir nas propriedades da massa do pão durante o seu processamento (BRESSIANI *et al.*, 2017; OU *et al.*, 2019). Atributos de qualidade tecnológica e sensoriais como sabor, cor e textura dos alimentos elaborados com ingredientes de grãos integrais, folhas e ervas devem ser otimizados para melhorar e aumentar a aceitação por parte dos consumidores.

1.3 Propriedades de massa e panificação

O trigo possui propriedades únicas em relação a outros cereais, pois contém as proteínas do glúten, que são responsáveis pela formação da massa com características específicas para a panificação. As proteínas são classificadas em dois grupos, diferenciando-se pela

funcionalidade, gliadinas e gluteninas. As gliadinas são conhecidas por fornecer viscosidade à massa, enquanto que as gluteninas proporcionam força e elasticidade (WANG *et al.*, 2007).

O processo de formação da massa com propriedades de panificação inicia-se na etapa de mistura, na qual a farinha de trigo é hidratada e submetida à ação mecânica de amassamento, provocando a transformação das proteínas do glúten em uma rede viscoelástica (SINGH *et al.*, 2011; CAPELLI *et al.*, 2020). Esta rede viscoelástica desempenha função na manutenção do dióxido de carbono, que é produzido durante a etapa de fermentação e nas fases iniciais de cozimento da massa (GRENIER *et al.*, 2021).

Quando se utiliza a farinha integral, o processo para formação de massa é o mesmo utilizado na farinha refinada. Contudo, a farinha de trigo integral geralmente interfere negativamente na formação de massa, refletindo nas propriedades tecnológicas e sensoriais dos produtos de panificação. Os principais efeitos são diminuição do volume, alteração na textura, mudanças na aparência e no sabor (SIBAKOV *et al.*, 2015; HEINIÖ *et al.*, 2016). Estudos sugerem que os efeitos observados na qualidade do pão são causados por interações fibra-glúten; contudo, os compostos fenólicos, em geral, também podem se ligar na rede de glúten impedindo a sua formação completa, e no caso da farinha de trigo integral, o ácido ferúlico é considerado o composto majoritário e de maior influência (TEBBEN *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2019).

Além disso, diversos estudos relatam sobre os efeitos tecnológicos e sensoriais nos produtos quando farinhas de trigo refinadas ou integrais são enriquecidas com outras fontes de compostos com ação bioativa, como ervas, plantas e especiarias (GAWLIK-DZIKI *et al.*, 2015; NING *et al.*, 2017; LIN; ZHOU, 2018; ĐUROVIĆ *et al.*, 2020). De acordo com uma revisão de Dziki *et al.* (2014), os ingredientes vegetais podem melhorar a atividade antioxidante de pães; no entanto, a maioria dos ingredientes ativos influencia nas propriedades tecnológicas e sensoriais do produto final.

De fato, a adição de compostos fenólicos provenientes de outras matrizes alimentares, como as plantas, representa um desafio na área de processamento de pães. Essas interferências são geralmente decorrentes da ação antioxidante dos compostos fenólicos, uma vez que possuem ação redutora, e, conforme relatado na literatura, podem afetar negativamente as propriedades reológicas da massa, resultando em menor tempo de desenvolvimento e tolerância à mistura da massa, e também nos atributos de qualidade do pão, incluindo a redução de volume e modificação da textura (XU *et al.*, 2019).

Entretanto, o estudo realizado por Wang *et al.* (2015) demonstrou que a adição de taninos foi capaz de promover a polimerização das proteínas do glúten, auxiliando nas

propriedades de massa e tempo de mistura, favorecendo o desenvolvimento da massa. Ning e colaboradores (2017) realizaram um estudo visando a adição de folhas de chá verde para a elaboração de pães integrais, e observaram que ocorreu aumento no teor de compostos fenólicos e na vida útil do produto, decorrente da presença das catequinas que possuem propriedades antifúngicas.

Vale ressaltar que o tamanho de partícula, tanto da farinha quanto da matriz utilizada como ingrediente funcional, como é o caso das folhas de erva-mate, podem interferir no processamento do pão, alterando sua qualidade tecnológica, volume e a textura. Um estudo realizado por Bressiani *et al.* (2017), em que avaliaram diferentes tamanhos de partículas de farinhas de grão inteiro de trigo, demonstrou que a farinha de menor tamanho de partícula apresentou maior conteúdo fenólico, porém, o pão elaborado com o menor tamanho de partícula de farinha não obteve resultados satisfatórios para a qualidade tecnológica, acarretando na diminuição do volume do mesmo. Kopjar *et al.* (2015) estudaram diferentes tamanhos de partículas de chá verde, amarelo e preto e verificaram que o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante estão diretamente relacionados com o a diminuição do tamanho de partícula, pois acarretou na maior exposição dos compostos devido à maior área de contato das folhas.

Além disso, a proporção das folhas de erva-mate incorporada na formulação também pode ser um interferente na qualidade do produto final. Ananingsih *et al.* (2012), em um estudo com folhas de chá verde adicionadas em pães de forma em diferentes proporções, demonstraram que as propriedades nutricionais dos pães foram melhoradas com o aumento da concentração. Entretanto, a reologia da massa e a qualidade tecnológica foram afetadas negativamente. Similarmente, Seczyk *et al.* (2017), em um estudo com folhas de quinoa, observaram que o potencial antioxidante dos pães aumentou conforme o aumento da proporção de folhas, com concomitante diminuição da qualidade tecnológica dos pães.

Embora a adição de compostos fenólicos seja uma alternativa promissora para a elaboração de produtos com características funcionais, como é o caso de pães, é importante ressaltar que o potencial antioxidante em produtos de panificação é dependente das condições de processamento, e por isso, estas etapas devem ser estudadas, para garantir a funcionalidade desejada do produto final.

1.4 Efeito do processamento do pão na composição fenólica

O processamento do pão é considerado um dos fatores determinantes para garantir a composição fenólica no produto final. O processamento dos pães é dividido em quatro operações básicas: mistura, formação de massa, fermentação e cocção (TIAN *et al.*, 2021). Contudo, as etapas de fermentação e cocção podem determinar as características funcionais e de qualidade do pão. Por isso, os potenciais efeitos dos compostos fenólicos na saúde dependem de sua estabilidade ou transformação durante a elaboração do pão (GERM *et al.*, 2019).

Geralmente os compostos fenólicos livres (solúveis) são os primeiros a serem degradados quando submetidos a altas temperaturas (forneamento), enquanto que os compostos fenólicos ligados (insolúveis) são liberados na matriz durante o processamento (FAKHFAKH *et al.*, 2017). Lu *et al.* (2015) demonstraram que os ácidos fenólicos foram relativamente estáveis durante a cocção dos pães. Já Han e Koh (2011) observaram que a atividade antioxidante e os níveis de ácidos fenólicos livres foram reduzidos pelo processo de mistura, no entanto, após a fermentação e cocção observaram aumento do teor de fenólicos totais.

Tem sido relatado que alguns compostos não são termicamente estáveis, podendo sofrer degradação quando são submetidos a altas temperaturas, ocasionada pela clivagem da porção glicosil da aglicona, levando a alteração na disponibilidade do composto original (WANG *et al.*, 2015; OU *et al.*, 2019). Por outro lado, um estudo realizado por Verardo *et al.* (2018) demonstrou que a mistura da massa e a fermentação facilitou a liberação de compostos fenólicos livres. Geralmente o aumento da composição fenólica livre se deve a liberação dos fenólicos ligados na parede celular da matriz alimentícia; isso porque, alguns compostos fenólicos podem existir em complexos com proteínas e carboidratos, e quando sofrem alguma ação química ou física, estes compostos se tornam mais disponíveis para serem quantificados (YU; BETA, 2015).

Cabe ressaltar que a alteração da composição fenólica final pode ser devido a interações químicas e físicas ocasionadas pelo processo de mistura, como também, pelo cozimento do pão, uma vez que os fenólicos podem se ligar a outros componentes do alimento, por exemplo amido e proteína (CUI; ZHU, 2022). Com isso, essas interações afetam diretamente as propriedades físico-químicas do produto, como alteração no valor nutricional e na disponibilidade dos compostos no organismo.

Diante do exposto, apesar dos produtos de panificação serem considerados bons veículos para incorporação de ingredientes potencialmente ativos, ainda existem muitos desafios, uma vez que se busca agregar valor nutricional e funcional e muitas vezes o

processamento dos pães pode desencadear na perda biológica destes compostos. Assim, buscando minimizar possíveis alterações e/ou perdas na qualidade, deve-se realizar o estudo de meios de incorporação destes ingredientes bioativos, bem como as formas de processamento dos pães visando manter as características de qualidade adequadas no produto final.

1.5 Bioacessibilidade dos compostos fenólicos em modelos de digestão simulada *in vitro*

O enriquecimento de alimentos com ingredientes que possuem atividade bioativa tem influência direta na saúde do homem, no entanto, esses compostos podem ser alterados durante o processo gastrointestinal, afetando o valor nutricional em relação à bioacessibilidade e biodisponibilidade no organismo (SWIECA *et al.*, 2018). Algumas dessas alterações são ocasionadas por interações com a matriz alimentar, bem como efeito inibitório dos fenólicos provocados pelas enzimas digestivas (SWIECA *et al.*, 2017).

O conhecimento das mudanças físico-químicas que ocorrem nos alimentos durante o processo digestivo e os diversos fatores que influenciam a bioacessibilidade dos compostos fenólicos se faz necessário para promover o desenvolvimento de novos produtos funcionais, uma vez, que a ingestão diária destes componentes bioativos fornecem benefícios à saúde (SENGUL; NILUFER, 2014; LUCAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

A bioacessibilidade é definida como a quantidade de um determinado composto que é liberado de sua matriz alimentar no trato gastrointestinal e que, portanto, estará disponível para absorção intestinal, sendo este o primeiro fator limitante para a investigação da biodisponibilidade (KARÁS *et al.*, 2017). O estudo da bioacessibilidade fornece informações fundamentais para o entendimento da ingestão dos nutrientes podendo assegurar a eficácia nutricional dos produtos alimentares, já que é necessário que o composto químico atinja o alvo fisiológico em concentração mínima exercendo assim seu efeito *in vivo* (BLANCO CANALIS *et al.*, 2020). Já a biodisponibilidade, refere-se à quantidade que determinado composto digerido, liberado e absorvido e estará circulante no organismo humano para ser distribuído nos diferentes tecidos do corpo (PALAFOX-CARLOS *et al.*, 2011; LUCAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

Os compostos fenólicos presentes nos alimentos são associados a benefícios à saúde humana quando ingeridos regularmente, todavia, nos últimos anos tem se discutido com maior ênfase a relação do seu potencial bioativo e a sua biodisponibilidade no organismo (TAKÁCS *et al.*, 2018; KETNAWA *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2022; YAGCI *et al.*, 2022). Geralmente, a biodisponibilidade dos compostos bioativos depende da sua estabilidade durante a digestão, da

sua liberação da matriz alimentar (designada bioacessibilidade) e da eficiência de absorção e distribuição para os tecidos do organismo. As condições no trato gastrointestinal, como as enzimas digestiva e o pH do estômago, podem influenciar diretamente as estruturas e funções dos compostos fenólicos (CÖMERT; GÖKMEN, 2020). Modelos de digestão *in vitro* têm sido amplamente utilizados para estudar as possíveis alterações estruturais, a sua digestibilidade e a liberação dos componentes alimentares sob as condições gastrointestinais simuladas (MINEKUS *et al.*, 2014).

Estes modelos foram desenvolvidos para simular, de forma estática ou dinâmica, as condições fisiológicas e a sequência de eventos que ocorre durante a digestão no trato gastrointestinal. É possível observar o comportamento das condições físico-químicas que ocorrem durante a digestão, sendo considerado as três áreas do sistema digestório: boca, estômago e intestino delgado. As principais características são a temperatura, a movimentação e a composição química ou enzimática da saliva, do suco gástrico, do suco duodenal e da bile, que são similares as do organismo humano (CORREA-BETANZO *et al.*, 2014; MINEKUS *et al.*, 2014).

Dados referentes a interação entre os compostos fenólicos e a matriz alimentar são escassos, no entanto, sabe-se que a biodisponibilidade dos compostos fenólicos é diretamente influenciada por constituintes presentes na matriz, com possíveis interações entre proteínas, lipídios, carboidratos e fibras (SENGUL *et al.*, 2014; SEÇZYK *et al.*, 2021). Alguns autores relataram alterações significativas que a matriz alimentar pode provocar na bioacessibilidade dos compostos fenólicos durante a digestão. Tais efeitos foram descritos para produtos de panificação enriquecidos com ingredientes bioativos como casca de cebola (SWIECA *et al.*, 2013), folhas de salsa (SEÇZYK *et al.*, 2016), e café verde (SWIECA *et al.*, 2017; SWIECA *et al.*, 2018).

De fato, o processo digestivo pode influenciar diretamente no tempo e na taxa de liberação desses compostos e, portanto, a digestão pode ser um fator crucial para determinar a sua bioacessibilidade e bioatividade em diferentes locais do trato gastrointestinal (TAKÁCS *et al.*, 2018). Ainda, os compostos fenólicos são altamente sensíveis às condições alcalinas no intestino delgado e modificações estruturais podem resultar em mudanças na sua atividade antioxidante (BOAVENTURA *et al.*, 2015). De acordo com Giusti *et al.* (2019) os fenólicos podem ser liberados da matriz em uma quantidade limitada durante o processo de digestão. Isso ocorre pela interação física entre os fenólicos livres e o material da parede celular, e, portanto, existem em baixas quantidades para serem absorvidos na etapa intestinal. Ainda, a ligação existente entre os polissacarídeos e os ácidos fenólicos ligados sofrem impedimento de

clivagem por enzimas pancreáticas devido às ligações covalentes, e assim, não são liberados durante o processo (KETNAWA *et al.*, 2021).

Sabe-se que uma elevada atividade antioxidante *in vitro* nem sempre é reproduzida da mesma forma *in vivo* (GONZÁLEZ-SARRÍAS *et al.*, 2015; SIVIERO *et al.*, 2015). Portanto, é fundamental determinar a bioacessibilidade dos produtos finais, para garantir a atividade biológica do composto. Um estudo realizado por Swieca *et al.* (2017) demonstrou que um pão fortificado com café verde apresentou resultados satisfatórios em relação a liberação de compostos fenólicos durante a digestão simulada *in vitro*, além de demonstrar que os compostos fenólicos introduzidos na matriz foram potencialmente bioacessíveis e biodisponíveis. Adicionalmente, Takács e colaboradores (2018) quando avaliaram o potencial bioativo de espaguete de trigo, observaram que a matriz alimentar pode interferir na liberação dos compostos fenólicos quando submetidos a digestão simulada *in vitro*, apesar dos resultados positivos em relação a liberação de ácidos fenólicos durante a digestão neste mesmo estudo. De acordo com Colantuono *et al.* (2018), a incorporação de ingredientes ativos pode aumentar a bioacessibilidade de compostos fenólicos no pão.

Desta forma é importante avaliar a bioacessibilidade de diferentes matrizes alimentares, como é o caso do pão integral elaborado com erva-mate. Torna-se relevante investigar as modificações ocorridas durante o processo de digestão simulada *in vitro* dos compostos fenólicos presentes nestes pães, uma vez que a incorporação de ingredientes bioativos, como a erva-mate, não garante a sua real atividade biológica.

REFERÊNCIAS

- ANANINGSIH, V.K.; GAO, J.; ZHOU, W. Impact of green tea extract and fungal alpha-amylase on dough proofing and steaming. **Food and Bioprocess Technology**, v.6, p.3400–3411, 2012.
- ALARA, C.R.; ABDURAHMAN, N.H.; UKAEGBU, C.I. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, v.4, p.200-2014, 2021.
- BAEZA, G. *et al.* Polyphenol content, *in vitro* bioaccessibility and antioxidant capacity of widely consumed beverages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.98, p.1397-1406, 2018.
- BERTÉ, K.A.S. **Tecnologia da erva-mate solúvel**. Tese (doutorado) Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Curitiba, 2011.
- BENÍTEZ, V. *et al.* Breads fortified with wholegrain cereals and seeds as source of antioxidant dietary fiber and other bioactive compounds. **Journal of Cereal Science**, v.82, p.113-120, 2018.
- BOAVENTURA, B. C. B. *et al.* Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex Paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**, v.53, p.686-692, 2013.
- BOAVENTURA, B.C.B. *et al.* Effect of *in vitro* digestion of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) extract on the cellular antioxidant activity, antiproliferative activity and cytotoxicity toward HepG2 cells. **Food Research International**, v. 77, p. 257-263, 2015.
- BUTIUK, A.P. *et al.* Optimization and modeling of the chlorogenic acid extraction from a residue of yerba mate processing. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v.25, p.100329, 2021.
- BLANCO CANALIS, M.S. *et al.* Effect of peach puree incorporation on cookie quality and on simulated digestion of polyphenols and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.333, p.127464, 2020.
- BRACESCO, N. *et al.* Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v.136, p.378-384, 2011.
- BRACESCO, N. *et al.* Analysis of radioprotection and antimutagenic effects of *Ilex paraguariensis* infusion and its component rutin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.51, p.1-8, 2018.
- BRACESCO, N. *Ilex paraguariensis* as a healthy food supplement for the future world. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v.16, p.1-3, 2019.
- BRESSIANI, J. *et al.* Properties of whole grain wheat flour and performance in bakery products as a function of particle size. **Journal of Cereal Science**, v.75, p.269-277, 2017.

- CAPPELLI, A.; BETTACCINI, L.; CINI, E. The kneading process: A systematic review of the effects on dough rheology and resulting bread characteristics, including improvement strategies. **Trends in Food Science & Technology**, v.104, p.91-101, 2020.
- CAPPELLI, A.; LUPORI, L.; CINI, E. Baking technology: A systematic review of machines and plants and their effect on final products, including improvement strategies. **Trends in Food Science & Technology**, v.115, p.275–284, 2021.
- CITTADINI, M. C. *et al.* Effects of oral phytoextract intake on phenolic concentration and redox homeostasis in murine encephalic regions. **Nutritional Neuroscience**, v.18, p.316–322, 2015.
- COLPO, A. C. *et al.* Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) - based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. **Food Chemistry**, v.209, p.185-195, 2016.
- COLPO, A.C. *et al.* Compounds from *Ilex paraguariensis* extracts have antioxidant effects in the brains of rats subjected to chronic immobilization stress. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, v.42, p.1172-1178, 2017.
- CÖMERT, E. D.; GÖKMEN, V. Effect of food combinations and their co-digestion on total antioxidant capacity under simulated gastrointestinal conditions. **Current Research in Food Science**, v.5, p.414-422, 2022.
- CORREA-BETANZO, J. *et al.* Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v.165, p.522-531, 2014.
- CUI, R.; ZHU, F. Changes in structure and phenolic profiles during processing of steamed bread enriched with purple sweetpotato flour. **Food Chemistry**, v.369, p.130578, 2022.
- CHIESA, L.; SCHLABITZ, C.; SOUZA, C. F. V. Effect of yerba mate on the sensory and physicochemical characteristics of cereal bars. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v.71, p.105–110, 2012.
- DA SILVEIRA, T.F.F. *et al.* Phenolic compounds from yerba mate based beverages-A multivariate optimisation. **Food Chemistry**, v.190, p.1159–1167, 2016
- DA SILVEIRA, T.F.F. *et al.* Chlorogenic acids and flavonoid extraction during the preparation of yerba mate based beverages. **Food Research International**, v.102, p.348-354, 2017.
- DAVIES-HOES, L. D. *et al.* Effect of Pea flours with different particle sizes on antioxidant activity in pan breads. **Cereal Chemistry**, v.94, p.866-872, 2017.
- ĐUROVIĆ, S. *et al.* The functional food production: Application of stinging nettle leaves and its extracts in the baking of a bread. **Food Chemistry**, v.312, p.126091, 2020.
- DHEN, N. *et al.* Physicochemical and sensory properties of wheat – Apricot kernels composite bread. **LWT – Food Science and Technology**, v.95, p.262-267, 2018.

DZIKI, D. *et al.* Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds. **Trends in Food Science and Technology**, v.40, p.48-61, 2014.

FACCIN, C. *et al.* Bread with Yerba Mate aqueous extract (*Ilex paraguariensis* A.St. Hil.). **American Journal of Food Technology**, v.10, p.206–214, 2015.

FAKHFAKH, N. *et al.* The mallow, *Malva aegyptiaca* L. (Malvaceae): Phytochemistry analysis and effects on wheat dough performance and bread quality. **LWT – Food Science and Technology**, v.75, p.656-662, 2017.

FERNANDES, C.E.F. *et al.* Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v.81, p.139–146, 2016.

FERRARIO, M. *et al.* Development and quality assessment of a turbid carrot-orange juice blend processed by UV-C light assisted by mild heat and addition of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) extract. **Food Chemistry**, v.269, p.567-576, 2018.

GAWLIK-DZIKI, U. *et al.* Bread enriched with *Chenopodium quinoa* leaves powder e the procedures for assessing the fortification efficiency. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p.1226-1234, 2015.

GERM, M. *et al.* The temperature threshold for the transformation of rutin to quercetin in tartary buckwheat dough. **Food Chemistry**, v.283, p.28-31, 2019.

GIUSTI, F. *et al.* A comprehensive investigation of the behaviour of phenolic compounds in legumes during domestic cooking and *in vitro* digestion. **Food Chemistry**, v.285, p.458–67, 2019.

GOMES, M.S.; FLORIANI, L.R.; MURAKAMI, F.S.; Controle de qualidade microbiológico e avaliação da eficácia de conservante em bebida energética a base de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.93, p.326-330, 2012.

GONZÁLEZ-SARRÍAS, A. *et al.* Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: A crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of pomegranate extracts. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 225–235, 2015.

GRENIER, D. *et al.* Gas cell opening in bread dough during baking. **Trends in Food Science & Technology**, v.109, p.482-498, 2021.

HAN, H.M.; KOH, B.K. Antioxidant activity of hard wheat flour, dough and bread prepared using various processes with the addition of different phenolic acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, p.604-608, 2011.

HECK, C.I.; MEJIA, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive Review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v.72, p.138-151, 2007.

HEINIÖ, R.L. *et al.* Sensory characteristics of wholegrain and bran-rich cereal foods – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.47, p.25-38, 2016.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da extração vegetal e da silvicultura**, v. 35, p. 1-8, 2020.

JONES, J. M. *et al.* Nutritional impacts of different whole grain milling techniques: A Review of milling practices and existing data. **Cereal Foods World**, v.60, p.130-139, 2015.

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

KARÁS, M. *et al.* Digestion and bioavailability of bioactive phytochemicals. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 291-305, 2017.

KETNAWA, S. *et al.* Changes in bioactive compounds and antioxidant activity of plant-based foods by gastrointestinal digestion: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p.1-22, 2021.

KOPJAR, M.; TADIC, M.; POLIZOTA, V. Phenol content and antioxidant activity of green, yellow and black tea leaves. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v.2, 2015.

LIN, J.; ZHOU, W. Role of quercetin in the physicochemical properties, antioxidant and antiglycation activities of bread. **Journal of Functional Foods**, v.40, p.299–306, 2018.

LU, Y. *et al.* Phytochemical profile and antiproliferative activity of dough and bread fractions made from refined and whole wheat flours. **Cereal Chemistry**, v.92, p.271-277, 2015.

LU, Y. *et al.* Changes in the phenolic acids composition during pancake preparation: Whole and refined grain flour and processed food classification by UV and NIR spectral fingerprinting method—Proof of concept. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.60, p.10-16, 2017.

LUCAS-GONZÁLEZ, R. *et al.* *In vitro* digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. **Food Research International**, v. 107, p. 423-436, 2018.

MARTINS, Z. E.; PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O. Food industry by-products used as functional ingredients of bakery products. **Trends in Food Science & Technology**, v.67, p.106-128, 2017.

MATEOS, R. *et al.* Improved LC-MS n characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.241, p.232–241, 2018.

MESSINA, D. *et al.* Efecto hipolipemiante del consumo de mate en individuos dislipidémicos. **Nutricion Hospitalaria**, v.31, p.2131-2139, 2015.

MINEKUS, M. *et al.* A standardized static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, v.5, p.1113–1124, 2014.

MICHALOWSKA-GRAMZA, A. *et al.* Antioxidative potential, nutritional value and sensory profiles of confectionery fortified with green and yellow tea leaves (*Camellia sinensis*). **Food Chemistry**, v.211, p.448-454, 2016.

NING, J. *et al.* Effect of green tea powder on the quality attributes and antioxidant activity of whole-wheat flour pan bread. **LWT – Food Science and Technology**, v.79, p.342-348, 2017.

OU, J. *et al.* Positive and negative effects of polyphenol incorporation in baked foods. **Food Chemistry**, v.284, p.90-99, 2019.

PALAFIX-CARLOS, H.; AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. 6-15, 2011.

PETRILLI, A.A. *et al.*, Effect of chocolate and yerba mate phenolic compounds on inflammatory and oxidative biomarkers in HIV/AIDS individuals. **Nutrients**, v.8, p.1-14, 2016.

PLUTA-KUBICA, A. *et al.* Active edible furcellaran/whey protein films with yerba mate and white tea extracts: Preparation, characterization and its application to fresh soft rennet-curd cheese. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.155, p.1307-1316, 2020.

RIGO, L. *et al.* **Análise do mercado da erva-mate no Brasil e no Rio Grande do Sul. Área Temática - D.** Estudos setoriais, cadeias produtivas, sistemas locais de produção. p.15, 2014.

RIACHI, L.G.; MARIA, A.B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v.38, p.308-320, 2017.

RIACHI, L.G. *et al.* Effect of light intensity and processing conditions on bioactive compounds in maté extracted from yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, v.266, p.317-322, 2018.

RICCIO, D.P. **Obtenção, caracterização e microencapsulação de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2019.

REN, F.; NIAN, Y.; PERUSSELO, C.A. Effect of storage, food processing and novel extraction technologies on onions flavonoid content: A review. **Food Research International**, v. 132, p.108953, 2020.

SANTOS, A.J. *et al.* Produtos não madeireiros: conceituação, classificação, valoração e mercados. **Revista Floresta**, v.33, p.215-224, 2003.

SANTOS, M.C.B. *et al.* Metabolomic approach for characterization of phenolic compounds in different wheat genotypes during grain development. **Food Research International**, v.124, p.118-128, 2019.

SANTETTI, G.S. *et al.* The addition of yerba mate leaves on bread dough has influences on fermentation time and the availability of phenolic compounds? **LWT – Food Science and Technology**, v.146, p.111442, 2021.

SENGUL, H.; SUREK, E.; NILUFER-ERDIL, D. Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an *in-vitro* gastrointestinal digestion model. **Food Research International**, v. 62, p. 1069–1079, 2014.

SEŃCZYK, Ł. *et al.* Antioxidant, nutritional and functional characteristics of wheat bread enriched with ground flaxseed hulls. **Food Chemistry**, v.214, p.32-38, 2017.

SEŃCZYK, Ł. *et al.* The effect of *in vitro* digestion, food matrix, and hydrothermal treatment on the potential bioaccessibility of selected phenolic compounds. **Food Chemistry**, v.344, p.128581, 2021.

SINGH, S.; SINGH, N.; MACRITCHIE, F. Relationship of polymeric proteins with pasting, gel dynamic- and dough empirical-rheology in different Indian wheat varieties. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.19-24, 2011.

SIBAKOV, R.N.; POUTANEN, K.; MICARD, V. How does wheat grain, bran and aleurone structure impact their nutritional and technological properties? **Trends in Food Science & Technology**, v.41, p.118-134, 2015.

SIVIERO, A. *et al.* Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. **Journal of Herbal Medicine**, v.5, p.57–70, 2015.

SORDINI, B. *et al.* A quanti-qualitative study of a phenolic extract as a natural antioxidant in the frying processes. **Food Chemistry**, v.279, p.426-434, 2019.

SWIECA, M. *et al.* The influence of protein-flavonoid interactions on protein digestibility *in vitro* and the antioxidant quality of breads enriched with onion skin. **Food Chemistry**, v.141, p.451-458, 2013.

SWIECA, M. *et al.* Bread enriched with quinoa leaves – The influence of protein – phenolics interactions on the nutritional and antioxidant quality. **Food Chemistry**, v.162, p.54-62, 2014.

SWIECA, M.S. *et al.* Wheat bread enriched with green coffee – *In vitro* bioaccessibility and bioavailability of phenolics and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.221, p.1451-1457, 2017.

SWIECA, M. *et al.* Interactions of green coffee bean phenolics with wheat bread matrix in a model of simulated *in vitro* digestion. **Food Chemistry**, v. 258, p. 301-307, 2018.

TAKÁCS, K. *et al.* Occurrence of targeted nutrients and potentially bioactive compounds during *in vitro* digestion of wheat spaghetti. **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 118-126, 2018.

TEBBEN, L.; SHEN, Y.; LI, Y. Improvers and functional ingredients in whole wheat bread: A review of their effects on dough properties and bread quality. **Trends in Food Science & Technology**, v.81, p.10-24, 2018.

TIAN, W. *et al.* Changes in phenolic profiles and antioxidant activities during the whole wheat flour bread-making process. **Food Chemistry**, v.345, p.128851, 2021.

VARGAS, B.K. *et al.* Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) microparticles modulate antioxidant markers in the plasma and brain of rats. **Food Bioscience**, v.41, p.100999, 2021.

VERARDO, V. *et al.* Determination of free and bound phenolic compounds and their antioxidant activity in buckwheat bread loaf, crust and crumb. **LWT - Food Science and Technology**, v.87, p.217-224, 2018.

VIEIRA, M.A. *et al.* Chemical characterization of candy made of Yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) residue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.4637–4642, 2008.

VIEIRA, L.C.G. **Características fitoquímicas e propriedades antioxidantes do grão de café verde**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Fernando Pessoa, Porto, 2015.

XU, J.; WANG, W.; LI, Y. Dough properties, bread quality, and associated interactions with added phenolic compounds: A review. **Journal of Functional Foods**, v.52, p.629-639, 2019.

YU, L.; BETA, T. Identification and antioxidant Properties of Phenolic Compounds during Production of Bread from Purple Wheat Grains. **Molecules**, v.20, p.15525–15549, 2015.

YAGCI, S. *et al.* Impact of tomato pomace powder added to extruded snacks on the *in vitro* gastrointestinal behaviour and stability of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v.368, p.130847, 2022.

ZANCHETT, C.S. *et al.* Development of white chocolate with yerba mate extract. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.19, 2016.

WANG, J.; ZHAO, M.; ZHAO, Q. Correlation of glutenin macropolymer with viscoelastic properties during dough mixing. **Journal of Cereal Science**, v.45, p.128-133, 2007.

WANG, Q. *et al.* Tannins improve dough mixing properties through affecting physicochemical and structural properties of wheat gluten proteins. **Food Research International**, v.69, p.64-71, 2015.

WU, H. *et al.* Effect of processing on bioaccessibility and bioavailability of bioactive compounds in coffee beans. **Food Bioscience**, v.46, p.101373, 2022.

CAPÍTULO 2

EFEITO DAS FOLHAS DE ERVA-MATE (*Ilex Paraguariensis*) NAS PROPRIEDADES DE MASSA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E QUALIDADE DO PÃO ELABORADO COM FARINHA DE TRIGO INTEGRAL

Nota: O texto e dados discutidos neste capítulo foram reproduzidos ou adaptados da publicação de autoria de Gabriela Soster Santetti, Marina Volpato Dacoreggio, Ana Carolina M. Silva, Barbara Biduski, Joseane Bressiani, Tatiana Oro, Alicia de Francisco, Luiz Carlos Gutkoski, Renata Dias de Mello C. Amboni, disponível em *Journal of Food Science*, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15909> (ANEXO A)

RESUMO

Este estudo investigou os efeitos da incorporação de diferentes proporções (1,5 2,5 e 4,5 g EM/100 g farinha de trigo integral (FTI)) e tamanhos de partícula (245, 415,5 e 623,9 μm) de folhas de erva-mate como ingrediente natural e funcional em pães de forma de farinha de trigo integral, avaliando o impacto nas propriedades antioxidantes, reológicas e de panificação. A adição das folhas de erva-mate levou a uma possível interação dos compostos fenólicos com a rede de glúten, sem afetar de forma negativa a formação da massa. No entanto, o tamanho de partícula maior de folha (623,9 μm) provocou maior enfraquecimento da rede proteica, resultando em um produto de qualidade inferior quando comparado às outras amostras. As melhores características de qualidade tecnológica de panificação (volume/firmeza/mastigabilidade) foram observadas quando as folhas de erva-mate foram adicionadas na proporção de 2,5 g/100g FTI. Ainda, os compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das farinhas e pães aumentaram conforme a adição de erva-mate. Além disso, os compostos fenólicos dos pães com 2,5 g/100 g FTI permaneceram estáveis durante o cozimento, não apresentando perdas significativas de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Os dados sugerem que a erva-mate pode ser incorporada em pães sem alterar a qualidade tecnológica, melhorando as suas características funcionais.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*; produtos de panificação; pão integral; produtos funcionais; compostos fenólicos.

ABSTRACT

This study investigated the effects of different yerba mate (YM) proportions (1.5, 2.5, and 4.5 g YM/100 g whole wheat flour (WWF)) and particle sizes (245, 415.5, and 623.9 μm) as a functional and natural ingredient in bread, evaluating on dough rheological properties, antioxidant activity, and bread characteristics. The addition of YM leaves led to a possible interaction between its phenolic compounds and the gluten network within the dough, without negative effects on dough formation. However, the larger YM particle size (623.9 μm) caused a weakening of the protein network, resulting in lower quality product compared to the other samples. Improved bread quality was found when the YM leaves were added at 2.5 g YM/100 g WWF. The total amount of phenolic compounds and the antioxidant activity increased as the proportion of YM increased in both flour and bread. Moreover, the phenolic compounds in 2.5 g YM/100 g WWF breads were stable during baking, showing no significant losses in the amount of phenolic compounds and antioxidant activity. These results suggest the YM can be successfully incorporated into baked product, improving its functional characteristics.

Keywords: *Ilex paraguariensis*; bakery products; whole meal bread; functional product; phenolic compounds.

1. INTRODUÇÃO

Os consumidores estão se tornando cada vez mais conscientes sobre os ingredientes utilizados nos produtos alimentícios. Esta atenção redobrada proporciona a oportunidade de desenvolver novos produtos com as propriedades nutricionais e funcionais melhoradas e alinhadas com o mercado atual, como a incorporação de fibras, frutas, hortaliças e grãos integrais. Isso aumenta significativamente o interesse por farinhas integrais (FTI) (CAPPELLI; CINI, 2021a; CAPPELLI; LUPORI; CINI, 2021b).

A utilização da FTI afeta as propriedades tecnológicas e sensoriais dos produtos de panificação, alterando a qualidade dos pães, reduzindo o volume e a elevando a firmeza (KOH; NG, 2009). Diversos estudos utilizaram ingredientes naturais para melhorar as propriedades e promover benefícios exigidos pelos consumidores, mantendo a qualidade do produto final (NING *et al.*, 2017; LIN; ZHOU, 2018). De fato, o enriquecimento de pães com diferentes ingredientes naturais pode promover a formação de massa, melhorar a qualidade nutricional, e aumentar a vida de prateleira do produto (GAWLIK-DZIKI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

É elucidado pela literatura que a erva-mate apresenta diversos efeitos biológicos quando ingerida na forma de chá mate ou como complemento funcional, como efeitos antiobesidade, hipocolesterolêmico, anti-inflamatório, antienvelhecimento e analgésico (BRACESCO *et al.*, 2011; GAN *et al.*, 2018). Além disso, quando destinada à alimentação, a segurança do consumo das folhas é assegurada. Neste sentido, estudos *in vivo* direcionam a aplicabilidade e demonstram que o seu consumo não apresenta riscos para a saúde humana, podendo ser considerada um antioxidante natural (de SOUZA *et al.*, 2019). Com isso, a inclusão da erva-mate (EM) em produtos de panificação é interessante, devido ao seu alto conteúdo de polifenóis, ácidos clorogênicos, xantinas, ácido cafeico e derivados, flavonoides e saponinas (BRACESCO *et al.*, 2011; MATEOS *et al.*, 2018; CHEMINET *et al.*, 2021).

As etapas do processamento dos pães, entretanto, podem interferir na qualidade do produto final, como também alterar a bioatividade dos compostos presentes nos pães. De acordo com Santetti *et al.* (2021), o processo de fermentação pode ser um fator determinante para a liberação de compostos fenólicos. Além disso, os compostos fenólicos podem interagir com outros componentes presentes na massa ou no pão, como a água, as proteínas do glúten e o amido. Segundo Ozdal, Capanoglu e Altay (2013), as proteínas e fenólicos podem interagir via ligações covalentes e/ou não-covalentes, que contribuem positivamente com a estrutura da massa, formação e desenvolvimento. Por outro lado, alguns compostos específicos podem interferir negativamente com as propriedades físico-químicas e reológicas da massa. Muitas

vezes, estes fenólicos alteram o desenvolvimento da massa, o índice de tolerância a mistura e a qualidade tecnológica dos pães, como o volume e a textura (XU *et al.*, 2019).

A erva-mate já foi utilizada para a produção de bebidas e também na incorporação de alimentos como barras de cereal, gelatinas, e pães elaborados com farinha refinada (BERTÉ *et al.*, 2011; CHIESA *et al.*, 2012; FACCIN *et al.*, 2015). No entanto, informações sobre o comportamento das folhas de erva-mate nas propriedades de panificação utilizando farinha de trigo integral (FTI) não foram relatadas. Como as propriedades de massa e panificação são cruciais na determinação da qualidade da farinha, é imprescindível o estudo das mudanças no uso final da farinha com a adição de erva-mate. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o impacto da proporção e tamanho de partícula da EM nas propriedades de massa, atividade antioxidante e qualidade do pão elaborado com FTI. As informações obtidas através deste estudo podem ser valiosas para orientar a qualidade e desempenho tecnológico de panificação da FTI com a adição de erva-mate.

2. MATERIAL E MÉTODOS

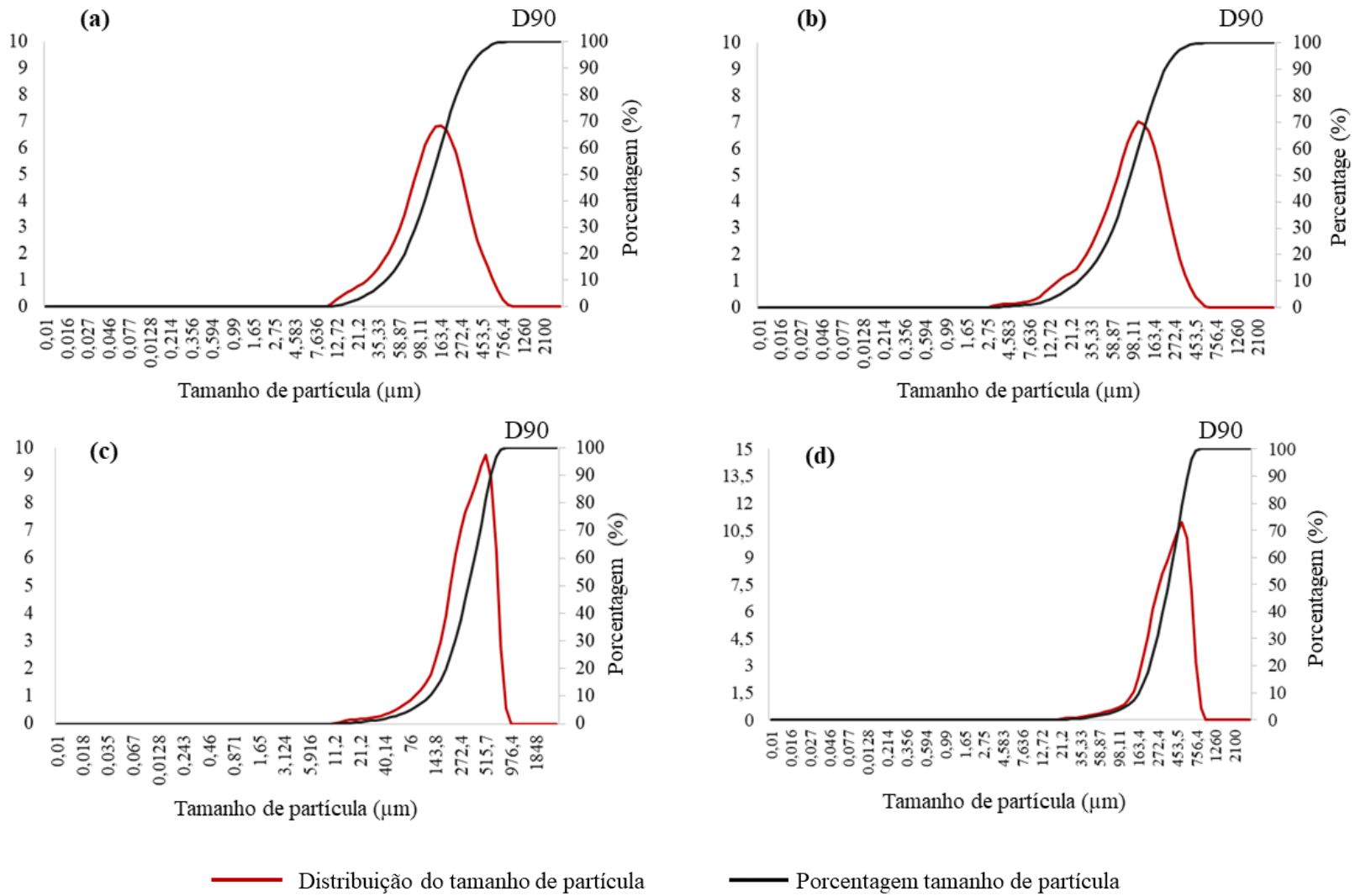
2.1 Material

Os grãos de trigo (*Triticum aestivum L.*) provenientes do cultivar Toruk, safra de 2017/18, foram fornecidos pela empresa Biotrigo Genética-Ltds, Passo Fundo, Brasil. As folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis St. Hil*) da colheita de 2017, foram fornecidas pela empresa Inovamate, Ilópolis, Brasil. Os ingredientes para a elaboração dos pães foram adquiridos no mercado local. Todos os reagentes químicos são de grau analítico.

2.2 Preparação da farinha de trigo integral e das folhas de erva-mate

A farinha de trigo integral (FTI) e as folhas de erva-mate (EM) foram preparadas de acordo com nosso estudo anterior (SANTETTI *et al.*, 2021). Para este estudo, três tamanhos de partículas de EM foram avaliados. O tamanho médio das partículas foram de 245, 415,5 e 623,9 μm (D90) (Figura 1), medido pelo analisador de partículas a laser (Bettersizer, S2-WD, China). As amostras foram nomeadas como EM fina, EM média e EM grossa, respectivamente.

Figura 1. Distribuição de tamanho de partícula da (a) farinha de trigo integral, (b) erva-mate fina, (c) erva-mate média e (d) erva-mate grossa.



A composição química das amostras de EM e FTI foi determinada e está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química da farinha de trigo integral e das folhas de erva-mate fina, média e grossa.

Composição	Tamanho de partícula			
	FTI	EM Fina	EM Média	EM Grossa
Umidade (g/100 g)	14,33 ± 0,04	6,08 ± 0,02	6,35 ± 0,01	7,89 ± 0,05
Proteínas (g/100 g bs)	12,84 ± 0,11	15,04 ± 0,01	15,01 ± 0,01	14,98 ± 0,01
Lipídios (g/100 g bs)	1,52 ± 0,04	6,23 ± 0,06	5,32 ± 0,04	5,78 ± 1,45
Cinzas (g/100 g bs)	1,85 ± 0,04	5,29 ± 0,06	5,16 ± 0,02	5,34 ± 0,07
Fibra alimentar total (g/100 g bs)	13,58 ± 0,01	37,95 ± 2,62	41,99 ± 1,39	46,10 ± 2,69
Fibra solúvel (g/100 g bs)	2,00 ± 0,44	5,30 ± 0,14	6,54 ± 0,66	8,10 ± 1,13
Fibra insolúvel (g/100 g bs)	11,58 ± 0,34	32,65 ± 2,76	35,45 ± 1,56	38,00 ± 1,56
CFT (mg AGE/100 g)	82,95 ± 0,84	2256,7 ± 157,63	1882,21 ± 13,62	1672,65 ± 185,09
ABTS (µM/Trolox g)	443,80 ± 18,01	32254,7 ± 296,16	25990,08 ± 215,37	22837,62 ± 210,49
FRAP (µM/Trolox g)	95,84 ± 1,70	5814,45 ± 186,22	5254,45 ± 170,24	4739,01 ± 196,88
DPPH (IC ₅₀ µg/mL)	1,84 ± 0,03	1,32 ± 0,01	2,02 ± 0,50	2,39 ± 0,01

EM: Erva-mate. EM fina: 245 µm. EM média: 415,5 µm. EM grossa: 623,9 µm. FTI: Farinha de trigo integral (controle). ABTS: Atividade antioxidante total pela captura de radicais livres ABTS⁺. FRAP: Poder antioxidante redutor de ferro. DPPH: Atividade antioxidante de eliminação de radicais livres. CFT: Compostos fenólicos totais. bs: Base seca.

2.3 Delineamento experimental

A FTI foi combinada com a EM (fina, média e grossa) em diferentes proporções. Para avaliar os efeitos da proporção e tamanho de partículas da EM nas propriedades da farinha e qualidade do pão, um planejamento fatorial completo foi realizado, totalizando nove tratamentos de g EM /100g FTI (m/m). Cada tratamento e a amostra controle (FTI) foram analisadas em triplicata (Tabela 2). Os níveis de EM selecionados foram baseados em estudos anteriores (dados não apresentados).

Tabela 2. Delineamento experimental para a incorporação de erva-mate na farinha de trigo integral.

Tratamentos	Erva-mate	
	Proporção (g/100 g; m/m)*	Tamanho de partícula
1	1,5	Fina
2	2,5	Fina
3	4,5	Fina
4	1,5	Média
5	2,5	Média
6	4,5	Média
7	1,5	Grossa
8	2,5	Grossa
9	4,5	Grossa
FTI	-	-

* g EM/100 g FTI. FTI: Farinha de trigo integral (controle). Fino: 245 μm . Médio: 415,5 μm . Grosso: 623,9 μm .

2.4 Composição química da matéria-prima

Os métodos padronizados da AOAC International (2005) foram utilizados para determinar a composição da EM (fina, média e grossa), incluindo o conteúdo de umidade (925.09), cinzas (923.09), proteínas (920.87), e lipídios (920.85). Da mesma forma, a composição química da FTI, incluindo o conteúdo de umidade, cinzas, proteínas, e lipídios, foram determinados por espectroscopia de refletância no infravermelho próximo (DS, 2500, FOSS), de acordo com a curva padrão para FTI. Para a fibra alimentar foi utilizado um ensaio enzimático-gravimétrico, de acordo com o método padrão da AACCI International (2010).

2.5 Propriedades de mistura e extensionais da massa

As propriedades de mistura dos nove tratamentos e da FTI foram determinadas de acordo com o método da AACCI nº 54-21.02 (2010) no equipamento Promilógrafo (T6E, Koloman Egger, Austria). Os parâmetros avaliados foram absorção de água (AA), índice de tolerância a mistura (ITM), tempo de desenvolvimento da massa (TDM) e estabilidade (E).

O teste de resistência à extensão e extensibilidade da massa foi realizado utilizando o analisador de textura (modelo TA-XT2i, Stable Micro Systems, Reino Unido), equipado com

o software *Exponent 32*, empregando *probe Kieffer Dough and Gluten Extensibility Rig* (A/KIE). As massas foram preparadas de acordo com o método descrito por Bressiani *et al.* (2017) e o teste foi realizado a 10 mm/s para uma distância de 75 mm.

2.6 Processamento e qualidade do pão

Os pães foram preparados utilizando o teste instrumental em pequena escala seguindo o método descrito por Bressiani *et al.* (2017). Resumidamente, a formulação foi composta de farinha (com e sem adição de erva-mate em diferentes proporções e tamanhos de partícula) (100 g), gordura vegetal hidrogenada (3 g/100 g farinha), cloridrato de sódio (12 g/100 g farinha), ácido ascórbico (0,01 g/100 g farinha), açúcar (5 g/100 g farinha), fermento (3 g/100 g farinha), e a água foi baseada na absorção de água da farinha obtida em 650 UF (± 20) na análise de farinografia. A massa foi dividida em porções de 35,0 g e a fermentação foi realizada em câmara de descanso (Multipão, Brasil) a 30 ± 1 °C, durante 60 minutos. A cocção dos pães foi realizada em forno de laboratório (QA 226, Labor Instruments Works, Hungria) a 150 °C por 12 minutos. O volume dos pães (cm³) foi determinado por deslocamento de sementes de painço de acordo com o método nº 10-05.01 (AACCI, 2010), e o volume específico (g/cm³) foi medido pelo volume do pão dividido pela massa do pão.

Os parâmetros firmeza (g) e mastigabilidade (g/s) dos pães foram avaliados em analisador de textura (TA.XTplus, Stable Micro Systems, Inglaterra) Os pães foram cortados em fatias de 25 mm de espessura e a crosta removida. A compressão de dois ciclos foi aplicada às amostras, que foram comprimidas a 50% de sua espessura inicial, utilizando uma sonda cilíndrica com 20 mm de diâmetro. Os parâmetros de teste foram: velocidade de pré-teste: 1,0 mm/s; velocidade de teste 1,7 mm/s; pós-teste: 10,0 mm/s; força de início: 5,0 g.

2.7 Análises químicas

Os polifenóis foram extraídos da EM como descrito por Asolini *et al.* (2006). Para os polifenóis livres na farinha e no pão, foi utilizado o método de extração descrito por Both *et al.* (2019). Previamente a extração, os pães foram liofilizados por 48 horas e moídos para passar numa peneira de 30 mesh (NING *et al.*, 2017).

Os compostos fenólicos totais (CFT) da erva-mate, farinhas e pães foram determinados utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (SINGLETON *et al.*, 1999). A quantificação foi baseada

na curva padrão de ácido gálico e os resultados foram expressos em mg ácido gálico equivalente por 100 g de amostra, em base seca (mg AGE/100 g).

A atividade do radical ABTS foi determinada de acordo com Re *et al.* (1999), o potencial antioxidante redutor férrico foi determinado através do ensaio de FRAP utilizando o protocolo estabelecido por Benzie e Strain (1996), e a atividade do radical DPPH foi determinado utilizando a metodologia descrita por Brand-Willians *et al.* (1995). Os resultados foram expressos em μmol Trolox equivalente por grama de amostra, em base seca (μmol Trolox/g), exceto a análise de DPPH, que o resultado foi expresso em IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

2.8 Análises estatísticas

Os testes analíticos foram realizados em três repetições. Os parâmetros reológicos e de qualidade dos pães foram avaliados utilizando ANOVA para analisar os efeitos e interações significativas entre os tamanhos de partículas e proporções da EM nas características de qualidade, com intervalo de confiança de 99 e 95%, utilizando o software SASM-Agri versão 8.2. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e o coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para comparar os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito das folhas de erva-mate nas propriedades de mistura da massa

As propriedades de mistura da massa estão apresentadas na Tabela 3. Os resultados demonstraram que o tamanho de partícula e a proporção da EM tiveram efeito significativo ($p < 0,01$) na absorção da água (%)(AA), estabilidade (min) (E), tempo de desenvolvimento da massa (min) (TDM) e índice de tolerância à mistura (U.P) (ITM), e também para a interação entre as variáveis (APÊNDICE A, Tabela 1).

Tabela 3. Propriedades de mistura das massas elaboradas pela incorporação de erva-mate na farinha de trigo integral.

Tamanho de partícula (μm)	Proporção de erva-mate (m/m)*			Proporção de erva-mate (m/m)*		
	1,5	2,5	4,5	1,5	2,5	4,5
	Absorção de água (%)			Tempo de desenvolvimento da massa (min)		
FTI		72,01 \pm 0,02			8,37 \pm 0,35	
EM Fina	74,38 \pm 0,32 ^{cC}	75,05 \pm 0,05 ^{bB}	78,15 \pm 0,05 ^{aA}	9,08 \pm 0,02 ^{aC}	8,81 \pm 0,02 ^{aC}	8,85 \pm 0,25 ^{aAB}
EM Média	76,02 \pm 0,02 ^{cA}	77,08 \pm 0,07 ^{bA}	78,04 \pm 0,01 ^{aA}	9,41 \pm 0,01 ^{aB}	9,41 \pm 0,01 ^{aA}	9,41 \pm 0,01 ^{aA}
EM Grossa	75,03 \pm 0,02 ^{bB}	75,30 \pm 0,20 ^{bB}	76,51 \pm 0,53 ^{aB}	9,52 \pm 0,01 ^{aA}	9,05 \pm 0,01 ^{bB}	8,80 \pm 0,30 ^{bB}
	Estabilidade (min)			Índice de tolerância à mistura (U.P)		
FTI		9,10 \pm 0,01			61,67 \pm 2,08	
EM Fina	3,62 \pm 0,01 ^{aB}	3,11 \pm 0,01 ^{cC}	3,33 \pm 0,01 ^{bA}	101,06 \pm 0,03 ^{cA}	109,07 \pm 0,04 ^{bA}	112,10 \pm 0,14 ^{aA}
EM Média	3,62 \pm 0,02 ^{aB}	3,31 \pm 0,01 ^{cB}	3,41 \pm 0,01 ^{bA}	97,05 \pm 0,07 ^{cB}	102,10 \pm 0,14 ^{bA}	107,08 \pm 0,03 ^{aA}
EM Grossa	3,81 \pm 0,01 ^{aA}	3,42 \pm 0,01 ^{bA}	3,30 \pm 0,20 ^{bA}	101,04 \pm 0,05 ^{bA}	110,50 \pm 0,70 ^{aA}	109,54 \pm 6,31 ^{aA}

Cada valor é apresentado como média \pm desvio padrão (n=3). * g EM/100 g FTI. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e letras minúsculas na mesma linha, diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, para cada parâmetro. EM fina: 245 μm . EM média: 415,5 μm . EM grossa: 623,9 μm . EM: Erva-mate. FTI: Farinha de trigo integral (controle). U.P: Unidades promilográficas.

A adição de 4,5% de erva-mate (m/m) aumentou a absorção de água (%) (AA), independentemente do tamanho de partícula, apresentando um ligeiro aumento comparado à amostra controle (Tabela 3). Além disso, a absorção de água da massa aumentou gradualmente ($p < 0,05$) à medida que a proporção de EM foi adicionada. Este fato pode ser explicado pela presença de fibras e compostos fenólicos da EM e da FTI, que promoveram interações entre a água e os grupos hidroxilas por meio de ligações de hidrogênio, ocasionando o aumento na AA (GÓMEZ *et al.*, 2020; CAPPELLI; MUGNAINI; CINI, 2020b). As massas elaboradas com os menores tamanhos de partículas da EM (fina e média) apresentaram a maior absorção de água comparado com a amostra controle. Isto provavelmente ocorreu, devido a fragmentação da parede celular das folhas durante o processo de moagem, que aumentou a área de superfície de contato. Essa superfície de contato expôs maiores quantidades de grupos hidroxilas dos compostos fenólicos e, conseqüentemente, aumentou as ligações (absorção) com a água (BOTH *et al.*, 2019). A absorção de água é um parâmetro importante para a panificação, e segundo Ma *et al.* (2019), uma maior absorção nas farinhas auxilia no retardamento da retrogradação e aumenta o rendimento da massa.

O tempo de desenvolvimento da massa (TDM) e a estabilidade (E) predizem a força da farinha e podem estar relacionadas com a absorção de água. Esta relação é baseada na superfície de contato das farinhas e na taxa de hidratação dos componentes da matriz. O tempo de mistura da massa de todos os tratamentos foi ligeiramente superior ($p < 0,05$) ao da amostra controle (FTI). Isso indica que a massa necessita de um tempo maior para se desenvolver completamente. Novamente, isso é devido a presença das fibras e compostos fenólicos da EM como componentes da matriz (BRESSIANI *et al.*, 2017; PEJCZ *et al.*, 2018; CAPPELLI *et al.*, 2020c). Já em relação a estabilidade da massa, esta apresentou diminuição após a incorporação da EM quando comparado com a FTI (controle). Isso pode estar relacionado à diluição da rede de glúten e alteração no comportamento da água, uma vez que os compostos fenólicos e as fibras competem por água com outros polímeros, como as proteínas e amido (SUN *et al.*, 2015; ZHU *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2019).

A presença de compostos fitoquímicos na EM pode afetar o desenvolvimento da matriz proteica durante a formação da massa. Santetti *et al.* (2021) reportaram que os ácidos fenólicos identificados nas massas elaboradas com EM podem interagir com o glúten durante a mistura e o processo de fermentação, como o ácido cafeico e o ácido clorogênico, que estão presentes nas folhas de erva-mate. Compostos fitoquímicos atuam

como agentes redutores e causam a ruptura das ligações dissulfeto na massa e no pão, enfraquecendo a rede de glúten, diminuindo assim, a estabilidade da massa durante o processo de mistura prolongado (BRESSIANI *et al.*, 2017).

O índice de tolerância à mistura (U.P) (ITM), que é inversamente proporcional a estabilidade, foi maior nas farinhas incorporadas de EM quando comparada a FTI (controle), para todos os tamanhos de partículas de EM. Geralmente, as farinhas classificadas como fracas apresentam maior ITM's. No entanto, deve-se enfatizar que o menor tamanho de partícula podem apresentar menor impacto na formação da massa, pois podem aderir melhor na rede de glúten (WANG *et al.*, 2018).

3.2 Efeito das folhas de erva-mate nas propriedades extensionais da massa

As propriedades extensionais da massa podem predizer o seu desempenho durante o processo de fermentação e cozimento do pão. Os resultados estão apresentados na Tabela 4. Os resultados indicaram que o tamanho de partícula e a proporção da EM têm efeito significativo ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) nas propriedades extensionais (APÊNDICE A, Tabela 1).

Tabela 4. Propriedades extensionais das massas elaboradas pela incorporação de erva-mate na farinha de trigo integral.

Tamanho de partícula (μm)	Proporção de erva-mate (m/m)*		
	1,5	2,5	4,5
Resistência a extensão (g)			
FTI	$38,46 \pm 2,06$		
EM Fina	$34,68 \pm 2,61$ ^{aC}	$35,23 \pm 0,58$ ^{aC}	$21,65 \pm 0,88$ ^{bC}
EM Média	$57,10 \pm 1,50$ ^{aA}	$47,89 \pm 0,58$ ^{bA}	$25,50 \pm 0,46$ ^{cB}
EM Grossa	$52,22 \pm 0,17$ ^{aB}	$40,22 \pm 0,81$ ^{bB}	$31,71 \pm 0,44$ ^{cA}
Extensibilidade (mm)			
FTI	$20,01 \pm 0,12$		
EM Fina	$26,21 \pm 1,35$ ^{aA}	$21,85 \pm 0,36$ ^{bA}	$26,54 \pm 0,98$ ^{aA}
EM Média	$24,23 \pm 0,36$ ^{aA}	$19,56 \pm 1,57$ ^{bA}	$24,66 \pm 2,46$ ^{bA}
EM Grossa	$17,14 \pm 0,88$ ^{bB}	$20,84 \pm 0,89$ ^{aA}	$16,09 \pm 1,74$ ^{bB}

Cada valor é apresentado como média \pm desvio padrão (n=3). * g EM/100 g FTI. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e letras minúsculas na mesma linha, diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, para cada parâmetro. EM fina: 245 μm . EM média: 415,5 μm . EM grossa: 623,9 μm . EM: Erva-mate. FTI: Farinha de trigo integral (controle).

A resistência à extensão, que é a capacidade de uma massa resistir a uma força aplicada, bem como sua tendência em retornar à sua forma original (elasticidade), diminuiu ($p < 0,05$) nas massas com a maior proporção de EM para todos os tamanhos de partícula. Este comportamento pode ser explicado pelo enfraquecimento da rede de glúten, possivelmente pela presença das fibras e compostos fitoquímicos da EM (BRESSIONI *et al.*, 2017; SANTETTI *et al.*, 2021).

Os maiores tamanhos de partículas (média e grossa) na menor proporção (1,5% m/m) apresentaram os maiores valores de resistência à extensão. Isto pode afetar negativamente a qualidade do pão, uma vez que massas mais rígidas são levemente extensíveis, causando a diminuição do volume específico do pão, devido à menor retenção de gás durante a fermentação (SCHEUER *et al.*, 2011).

A extensibilidade, considerada a medida da deformação da massa, diminuiu ($p < 0,05$) quando 2,5% EM (m/m) foi utilizada para todos os tamanhos de partículas. As massas elaboradas com o tamanho médio e fino da EM independente da proporção, apresentaram os melhores resultados para a extensibilidade, bem como para a resistência à extensão. Estes resultados são adequados para produtos de panificação, pois altos valores de extensibilidades levam a menor consistência da massa, enquanto que valores mais baixos podem produzir massas mais consistentes, o que não é ideal para a elaboração de pães (SCHEUER *et al.*, 2011).

Algumas alterações no desenvolvimento da massa ocorrem devido a presença de compostos fitoquímicos da erva-mate. Estes compostos possuem uma estrutura que contém ligações duplas ativadas que favorecem a interação com as ligações dissulfeto do glúten. Essas interações podem levar a menor resistência e aumento da extensibilidade da massa (HAN; KOH, 2011; ANANINGSIH *et al.*, 2013), conforme observado neste estudo. Por outro lado, Wang *et al.* (2015) demonstraram que a adição de taninos, que não possuem ligações duplas ativadas, aumentou a resistência ao desenvolvimento da massa, promovendo a agregação das proteínas e modificando positivamente a estrutura da rede de glúten. Além disso, de acordo com Lin e Zhou (2018), algumas ligações podem ser formadas entre as proteínas do glúten e os componentes adicionados na farinha; uma vez que estes compostos realizam ligações complexas que são capazes de neutralizar o impacto do enfraquecimento da rede de glúten em relação as ligações dissulfeto, e assim, favorecer a funcionalidade da massa. Com relação ao nosso estudo, foi observado que a os menores tamanhos de partículas da EM resultaram em melhor desenvolvimento da

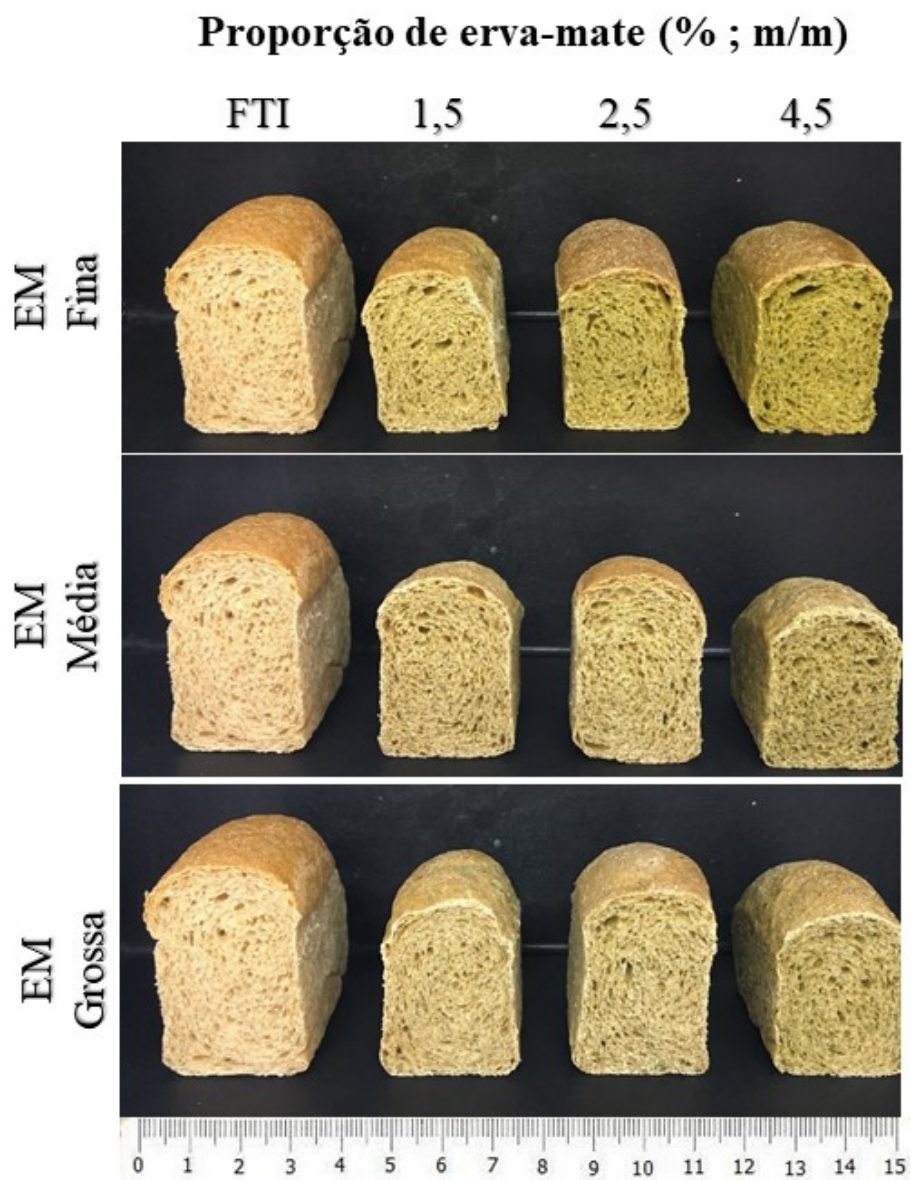
massa quando comparado às partículas maiores de EM adicionadas nas proporções de 2,5 e 4,5% de erva-mate (m/m) na FTI.

3.3 Qualidade dos pães enriquecidos com as folhas de erva-mate

As fotografias dos cortes transversais dos pães estão ilustradas na Figura 2. Todas as amostras apresentaram pequenos orifícios no miolo dos pães, provavelmente devido a força excessiva da massa durante a expansão no processo fermentativo, uma vez que a farinha utilizada possui alta força de glúten. Todos os tratamentos com EM apresentaram o volume específico do pão significativamente ($p < 0,05$) inferior ao pão controle (FTI) (APÊNDICE A, Tabela 1).

Com relação à qualidade dos pães, os resultados demonstram que o tamanho de partícula e a proporção da erva-mate apresentaram efeito significativo ($p < 0,01$), e ainda, que ocorreu uma interação entre as variáveis (APÊNDICE A, Tabela 1). O volume específico é uma das características visuais mais importantes do pão, e geralmente, um alto volume está associado à uma aeração adequada do pão (ELGETI *et al.*, 2014). O volume específico dos pães elaborados com a EM foi ligeiramente inferior quando comparado com a amostra controle (FTI) (Tabela 5). A adição de 2,5% de erva-mate (m/m), em todos os tamanhos de partículas, promoveu o maior volume específico ($p < 0,05$). No entanto, um aumento no tamanho de partícula (média e grossa) ocasionou uma redução no volume específico dos pães quando comparado ao pão elaborado com o tamanho de partícula fino, provavelmente, devido ao enfraquecimento da rede de glúten, o que resultou em um menor volume e conseqüentemente uma retenção de gás inadequada durante a fermentação.

Figura 2. Fotografias dos pães elaborados com a combinação de erva-mate em diferentes tamanhos de partículas e proporções na farinha de trigo integral.



FTI: Farinha de trigo integral (controle). EM Fina: 245 μm . EM Média: 415,5 μm . EM Grossa: 623,9 μm .

Tabela 5. Qualidade tecnológica de panificação dos pães elaborados com a incorporação de erva-mate na farinha de trigo integral.

Tamanho de partícula (μm)	Proporção de erva-mate (m/m)		
	1,5	2,5	4,5
Volume específico (g/cm^3)			
FTI	4,40 \pm 0,02		
Fina	3,39 \pm 0,02 ^{bA}	4,02 \pm 0,06 ^{aA}	3,23 \pm 0,03 ^{cB}
Média	2,64 \pm 0,03 ^{bB}	3,44 \pm 0,01 ^{aB}	3,57 \pm 0,03 ^{aA}
Grossa	2,65 \pm 0,01 ^{bB}	3,86 \pm 0,06 ^{aA}	2,67 \pm 0,06 ^{bC}
Firmeza (g)			
FTI	356,96 \pm 25,64		
Fina	375,14 \pm 12,56 ^{aC}	396,05 \pm 17,94 ^{aA}	344,52 \pm 12,43 ^{bB}
Média	518,10 \pm 7,74 ^{aA}	338,60 \pm 19,37 ^{cB}	382,57 \pm 0,71 ^{bA}
Grossa	461,75 \pm 7,86 ^{aB}	376,35 \pm 15,26 ^{bAB}	379,97 \pm 11,98 ^{bA}
Mastigabilidade (g/s)			
FTI	284,84 \pm 7,40		
Fina	293,30 \pm 4,09 ^{abC}	337,16 \pm 22,19 ^{aA}	168,32 \pm 5,10 ^{bB}
Média	417,31 \pm 3,99 ^{aA}	291,66 \pm 25,40 ^{bA}	310,55 \pm 11,47 ^{bA}
Grossa	373,79 \pm 15,37 ^{aB}	306,71 \pm 3,43 ^{bA}	301,68 \pm 16,56 ^{bA}

Cada valor é apresentado como média \pm desvio padrão (n=3). * g EM/100 g FTI. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e letras minúsculas na mesma linha, diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, para cada parâmetro. EM fina: 245 μm . EM média: 415,5 μm . EM grossa: 623,9 μm . EM: Erva-mate. FTI: Farinha de trigo integral (controle).

Pesquisadores sugerem que um máximo de adição de 3% (m/m) de ingredientes antioxidantes devem ser incorporados na massa de pão para evitar alterações no seu volume (BOUREKOUA *et al.*, 2018; ĐUROVIĆ, *et al.*, 2020; ALGBOORY *et al.*, 2021). Além disso, alguns autores reportaram que menores tamanhos de partículas dos ingredientes adicionais, interferem menos na estrutura do glúten durante o desenvolvimento da massa. Isto pode ser devido a maior superfície de contato dos menores tamanhos de partículas, que pode facilitar a sua incorporação na massa. Navrotskyi e colaboradores (2019) reportaram que os menores tamanhos de partículas promoveram maior volume específico e pães mais macios.

Por outro lado, maiores tamanhos de partículas possuem menor superfície de contato, o que faz com que elas se fixem na matriz proteica e danifiquem a estrutura do glúten (WANG *et al.*, 2018). De acordo com Sivam *et al.* (2010), alguns compostos fitoquímicos são capazes de formar complexos específicos com as proteínas e/ou

polissacarídeos da farinha. Dessa forma, a presença de compostos fenólicos da erva-mate pode auxiliar no desenvolvimento da massa.

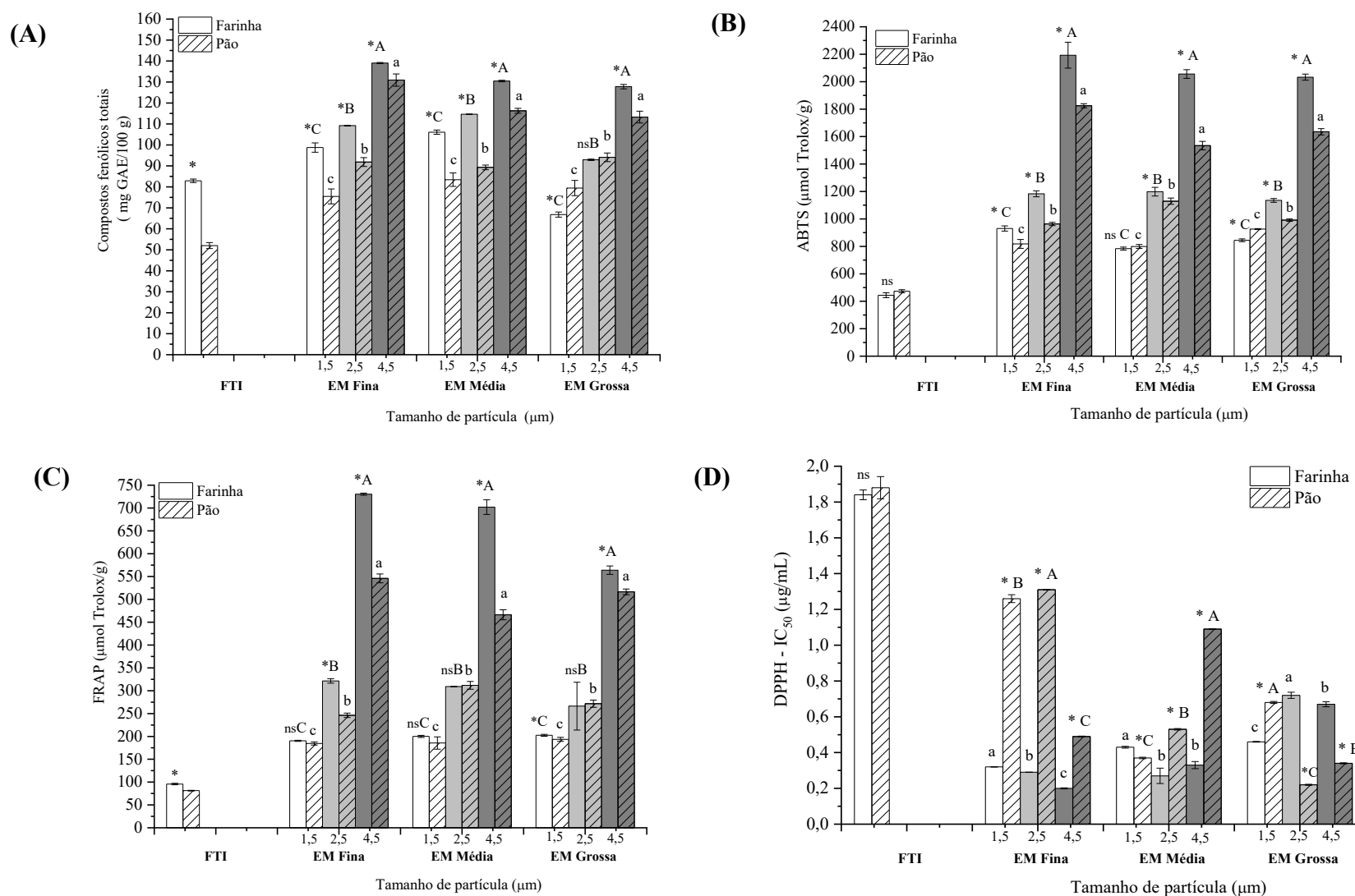
Uma diminuição significativa na firmeza e mastigabilidade ($p < 0,05$) foi observada nos pães que apresentaram o menor volume específico (Tabela 5). Os tratamentos elaborados com 2,5 e 4,5% EM (m/m) nos tamanhos de partícula fino e médio apresentaram os menores valores e firmeza e mastigabilidade comparado às amostras elaborados com a EM grossa.

3.4 Conteúdo fenólico total e atividade antioxidante dos pães e farinhas elaborados com erva-mate

O tamanho de partícula e a proporção de EM apresentaram efeito significativo para o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante das farinhas e dos pães elaborados com erva-mate ($p < 0,05$). Houve, também, uma interação significativa entre o tamanho de partícula e proporção da EM, como indicado na Tabela 1 – APÊNDICE A. Este efeito está diretamente relacionado ao maior conteúdo fenólico e conseqüentemente, a alta atividade antioxidante da erva-mate.

É amplamente conhecido que durante o processamento do pão, os compostos bioativos são ligeiramente reduzidos devido à sua degradação provocada pela temperatura de cocção (DZIKI *et al.*, 2014; NING *et al.*, 2017). De fato, foi observado que o CFT e a atividade antioxidante foram significativamente reduzidos quando comparados aos valores encontrados para a farinha e as amostras de pão (APÊNDICE A, Tabela 2). No entanto, o CFT aumentou gradativamente conforme o aumento da proporção de EM, tanto para as farinhas, quanto para os pães. Como mencionado, foi observado que o CFT diminuiu significativamente da farinha para o pão (para todos os tratamentos), exceto quando 4,5% EM (m/m) nos tamanhos fino e médio foi utilizado (Figura 3a). Com isso, massas de pães elaborados com a EM demonstraram o mesmo efeito, em que a maior proporção (4,5%; m/m) apresentou o maior CFT (SANTETTI *et al.*, 2021).

Figura 3. (a) Conteúdo fenólico total e (b), (c), (d) atividade antioxidante das farinhas e pães elaborado com diferentes proporções e tamanhos de partículas da erva-mate na farinha de trigo integral.



Cada valor é apresentado como média \pm desvio padrão (n=3). Letras maiúsculas diferentes, para farinha, e letras minúsculas, para pães, diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e as médias submetidas ao teste de Tukey, para cada tamanho de partícula. * ou ^{ns} significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste-T entre farinha e pão para cada proporção de EM e amostra controle (FTI). Erva-mate fina: 245 µm. Erva-mate media: 415,5 µm. Erva-mate grossa: 623,9 µm. FTI: Farinha de trigo integral (controle).

Em geral, o tamanho de partícula da EM foi inversamente proporcional a capacidade antioxidante das farinhas e pães testados (Figura 3b, 3c e 3d). Um aumento na proporção de EM elevou a capacidade antioxidante das farinhas e pães analisados pelos ensaios de ABTS e FRAP. O mesmo comportamento foi observado para o ensaio de DPPH, sendo que um valor baixo de IC_{50} está associado com uma alta atividade de eliminação de radicais DPPH. Embora o CFT tenha sido maior nos tratamentos elaborados com a maior proporção de 4,5% EM (m/m), em todos os tamanhos de partículas, estes compostos foram instáveis durante o processo de cozimento, o que causou uma redução na atividade antioxidante das amostras de pães. Esta redução não foi observada nos pães elaborados com 4,5% EM (m/m) das partículas finas e grossas para o ensaio de DPPH, quando o IC_{50} apresentou um aumento na atividade antioxidante tanto para as farinhas, quanto para os pães. Por outro lado, para os testes ABTS e FRAP, as amostras de pães elaboradas com 2,5% EM (m/m) nos tamanhos médio e grosso, demonstraram elevada capacidade antioxidante, mas sem diferirem entre farinha e pão ($p > 0,05$), para cada ensaio. Estas variações na capacidade antioxidante podem estar relacionadas a diversos fatores intrínsecos durante o processamento do pão.

Dessa forma, o CFT e a atividade antioxidante foram correlacionados positivamente para todos os tratamentos e nos ensaios de ABTS e FRAP, e para o ensaio DPPH foi correlacionado negativamente pelo fato do resultado de IC_{50} ser inversamente proporcional. Estas correlações foram determinadas pelo coeficiente de correlação de Pearson (r^2), ou seja, a medida que o conteúdo fenólico aumentou a atividade antioxidante também aumentou (r^2 farinhas: 0,81, 0,80 e -0,79; r^2 pães: 0,85, 0,84 e -0,81 pelos ensaios de ABTS, FRAP e DPPH, respectivamente).

As farinhas e pães elaborados com o tamanho de partícula da erva-mate fina apresentaram elevado conteúdo fenólico total e foram ligeiramente diferentes da amostra controle (farinha e pão). Isso sugere que quanto maior superfície de contato da erva-mate, maior será a exposição e extração dos compostos fenólicos. No entanto, a utilização do menor tamanho de partícula da EM foi associada com uma menor estabilidade dos compostos durante o cozimento do pão.

Durante a etapa de produção da massa, a hidratação e ação mecânica da massa podem ativar enzimas oxidativas, que levam à degradação de compostos fenólicos. Por outro lado, durante o processo de fermentação, novos compostos fenólicos podem ser gerados e liberados (HAN; KOH, 2011; DZIKI *et al.*, 2014). Esse fato pode ser confirmado pelo nosso estudo anterior, no qual a liberação de novos compostos fenólicos

ocorreu em diferentes tempos do processo fermentativo da massa de pão (SANTETTI *et al.*, 2021). Além disso, autores reportaram que a liberação e/ou estabilidade dos polifenóis durante o cozimento podem estar relacionadas a produtos derivados da reação de *Maillard*, a qual é importante para produtos de panificação, uma vez que fornece aos produtos sabor e cor, e pode apresentar atividade antioxidante (SIVAM *et al.*, 2010). Assim, as pequenas variações observadas nos compostos fenólicos neste estudo das farinhas para os pães com erva-mate podem ser justificadas por este fenômeno.

4. CONCLUSÃO

Este estudo revelou que o tamanho de partícula da erva-mate fina e média (≤ 245 e $415,5 \mu\text{m}$, respectivamente) nas proporções de 2,5 e 4,5% (m/m) demonstraram efeito positivo nas propriedades da massa e de panificação, aumentando o volume específico e reduzindo a firmeza, o que é considerado satisfatório para a qualidade de pães. Em contraste, o maior tamanho de partícula ($\geq 623,9 \mu\text{m}$) apresentou um efeito negativo nas propriedades da massa pelo enfraquecimento da rede de glúten. O conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante permaneceram estáveis após o processo de cozimento do pão, nos pães com 2,5 e 4,5% de erva-mate (m/m). Assim, a inclusão de EM na FTI pode melhorar a qualidade funcional e nutricional dos pães.

REFERÊNCIAS

AACCI. American Association of Cereal Chemists International. **Approved Methods of Analysis** (11 th ed.). St Paul, MN, USA: AACC International, 2010.

AOAC. Association of Official Analytical Chemistis. **Official Methods of Analysis of the AOAC**, 18th ed. Gaithersburg, M.D, USA, 2005.

ASOLINI, F.C.; TEDESCO, A.M.; CARPES, S.T. Antioxidant and antibacterial activities of phenolic compounds from extracts of plants used as Tea. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, p.209-215, 2006.

ANDRADE, F. *et al.* Safety assessment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) dried extract: Results of acute and 90 days sub chronic toxicity studies in rats and rabbits. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v.50, p.328–334, 2012.

ANANINGSIH, V.K.; SHARMA, A.; ZHOU, W. Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. **Food Research International**, v.50, p.469-479, 2013.

ALGBOORY, H.L.; KADUM, H.; MUHIALDINC, B.J. Shelf-life assessment of bread containing *Cyperus rotundus* rhizome aqueous extract with antimicrobial compounds identified by 1H-NMR. **LWT – Food Science and Technology**, v.140, p.110823, 2021.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, p.70-76, 1996.

BERTÉ, K.A.S. *et al.* Desenvolvimento de gelatina funcional de erva-mate. **Ciência Rural**, v.41, p.354-360, 2011.

BOAVENTURA, B.C.B. *et al.* Effect of *in vitro* digestion of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) extract on the cellular antioxidant activity, antiproliferative activity and cytotoxicity toward HepG2 cells. **Food Research International**, v.77, p.257-263, 2015.

BRACESCO, N. *et al* Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Mini review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.136, p.378–384, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, A.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

BRESSIANI, J. *et al.* Properties of whole grain wheat flour and performance in bakery products as a function of particle size. **Journal of Cereal Science**, v.75, p.269-277, 2017.

BOUREKOVA, H. *et al.* Evaluation of physical, sensorial, and antioxidant properties of gluten-free bread enriched with *Moringa Oleifera* leaf powder. **European Food Research Technology**, v.244, p.189-195, 2018.

BOTH, J. *et al.* Phenolic compounds and free sulfhydryl groups in whole grain wheat flour modified by xylanase. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.99, p.5392–5400, 2019.

CAPPELLI, A.; BETTACCINI, L.; CINI, E. The kneading process: A systematic review of the effects on dough rheology and resulting bread characteristics, including improvement strategies. **Trends in Food Science & Technology**, v.104, p.91–101, 2020a.

CAPPELLI, A.; MUGNAINI, M.; CINI, E. Improving roller milling technology using the break, sizing, and reduction systems for flour differentiation. **LWT–Food Science and Technology**, v.133, p.110067, 2020b.

CAPPELLI, A.; OLIVA, N.; CINI, E. A Systematic Review of Gluten-Free Dough and Bread: Dough Rheology, Bread Characteristics, and Improvement Strategies. **Applied Sciences**, v.10, p.6559, 2020c.

CAPPELLI, A.; CINI, E. Challenges and Opportunities in Wheat Flour, Pasta, Bread, and Bakery Product Production Chains: A Systematic Review of Innovations and Improvement Strategies to Increase Sustainability, Productivity, and Product Quality. **Sustainability**, v.13, p.2608, 2021a.

CAPPELLI, A.; LUPORI, L.; CINI, E. Baking technology: A systematic review of machines and plants and their effect on final products, including improvement strategies. **Trends in Food Science & Technology**, v.115, p.275–284, 2021b.

CHEMINET, G. *et al.* Antioxidant properties and phenolic composition of “Composed Yerba Mate”. **Journal Food Science and Technology**, v.58, p.4711-4721, 2021.

CHIESA, L.; SCHLABITZ, C.; DE SOUZA, C.F.V. Effect of yerba mate on the sensory and physicochemical characteristics of cereal bars. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, p.105-110, 2012.

SOUZA, W.R. *et al.* Evaluation of Reproductive Toxicology of Aqueous Extract of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil), a Traditional South American Beverage. **Journal of Medicinal Food**, v.22, p.97-101, 2019.

DZIKI, D. *et al.* Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds. **Trends in Food Science & Technology**, v.40, p.48-61, 2014.

ĐUROVIĆ, S. *et al.* The functional food production: Application of stinging nettle leaves and its extracts in the baking of a bread. **Food Chemistry**, v.312, p.126091, 2020.

- ELGETI, D. *et al.* Volume and texture improvement of gluten-free bread using quinoa white flour. **Journal of Cereal Science**, v.59, p.41–47, 2014.
- FACCIN, C. *et al.* Bread with Yerba Mate Aqueous Extract (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **American Journal of Food Technology**, v.10, p.206-257, 2015.
- GAWLIK-DZIKI, U. *et al.* Bread enriched with *Chenopodium quinoa* leaves powder and the procedures for assessing the fortification efficiency. **LWT – Food Science and Technology**, v.62, p.1226-1234, 2015.
- GAN, R. *et al.* Health benefits of bioactive compounds from the genus *ilex*, a source of traditional caffeinated beverages. **Nutrients**, v.10, p.1682, 2018.
- GÓMEZ, M.; GUTKOSKI L.C.; BRAVO-NÚÑEZ, Á. Understanding whole-wheat flour and its effect in breads: a review. **Comprehensive Review Food Science and Food Safety**. v.19, p.3241–3265, 2020.
- HAN, H.M.; KOH, N.K. Antioxidant activity of hard wheat flour, dough and bread prepared using various processes with the addition of different phenolic acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, p.604-608, 2011.
- KIM, S.Y. *et al.* Anti-obesity effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*): A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v.15, p.338, 2015.
- KOH, B.K.; NG, P.K.W. Effects of ferulic acid and transglutaminase on hard wheat flour dough and bread. **Cereal Chemistry**, v.86, p.18-22, 2009.
- KORUS, J. *et al.* Rapeseed protein as a novel ingredient of gluten-free bread. **European Food Research and Technology**, v. 247, p.2015-2025, 2021.
- LIN, J.; ZHOU, W. Role of quercetin in the physicochemical properties, antioxidant and antiglycation activities of bread. **Journal of Functional Foods**, v.40, p.299-306, 2018.
- MA, J. *et al.* The effects of extruded black rice flour on rheological and structural properties of wheat-based dough and bread quality. **International Journal of Food Science and Technology**, v.54, p.1729-1740, 2019.
- MATEOS, R. *et al.* Improved LC-MSⁿ characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and anti-oxidant activity. **Food Chemistry**, v.241, p.232-241, 2018.
- NAVROTSKYI, S. *et al.* Impact of wheat bran physical properties and chemical composition on whole grain flour mixing and baking properties. **Journal of Cereal Science**, v.89, p.102790, 2019.
- NING, J. *et al.* Effect of green tea powder on the quality attributes and antioxidant activity of whole-wheat flour pan bread. **LWT – Food Science and Technology**, v.79, p.342-348, 2017.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v.51, p.954-970, 2013.

OU, J. *et al.* Positive and negative effects of polyphenol incorporation in baked foods. **Food Chemistry**, v.284, p.90-99, 2019.

PEJ CZ, E. *et al.* The effect of *Plantago* seeds and husk on wheat dough and bread functional properties. **LWT – Food Science and Technology**, v.96, p.371-377, 2018.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying in improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p.1231-1237, 1999.

SANTETTI, G.S. *et al.* The addition of yerba mate leaves on bread dough has influences on fermentation time and the availability of phenolic compounds? **LWT – Food Science and Technology**, v.146, p.111442, 2021.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.

SIVAM, A.S. *et al.* Properties of bread dough with added fiber polysaccharides and phenolic antioxidants: A Review. **Journal of Food Science**, v.75, p.163-174, 2010.

SCHEUER, P. M. *et al.* Trigo: características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.13, p.910-916, 2011.

SUN, R. *et al.* (2015). Effect of wheat germ flour addition on wheat flour, dough and Chinese steamed bread properties. **Journal of Cereal Science**, v.64, p.153-158, 2015.

TURFANI, V. *et al.* Technological, nutritional and functional properties of wheat bread enriched with lentil or carob flour. **LWT – Food Science and Technology**, v.78, p.361-366, 2017.

XU, J.; WANG, W.; LI, Y. Dough properties, bread quality, and associated interactions with added phenolic compounds: A review. **Journal of Functional Foods**, v.52, p.629-639, 2019.

WANG, Q. *et al.* Tannins improve dough mixing properties through affecting physicochemical and structural properties of wheat gluten proteins. **Food Research International**, v.69, p.64-71, 2015.

WANG, J. *et al.* GlutoPeak method improvement for gluten aggregation measurement of whole wheat flour. **LWT – Food Science and Technology**, v.90, p.8-14, 2018.

ZHU, F.; SAKULNAK, R.; WANG, S. Effect of black tea on antioxidant, textural, and sensory properties of Chinese steamed bread. **Food Chemistry**, v.194, p.1217-1223, 2016.

CAPÍTULO 3

A ADIÇÃO DE FOLHAS DE ERVA-MATE NA MASSA DE PÃO TEM INFLUÊNCIA NA FERMENTAÇÃO E NA DISPONIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS?

Nota: O texto e dados discutidos neste capítulo foram reproduzidos ou adaptados da publicação de autoria de Gabriela Soster Santetti, Marina Volpato Dacoreggio, Heloisa Patrício Inácio, Barbara Biduski, Rodrigo Barcellos Hoff, Carlise Beddin Fritzen Freire a, Luiz Carlos Gutkoski, Renata Dias de Mello C. Amboni, disponível em *LWT – Food Science and Technology*, v.146, p. 111442, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111442> (ANEXO B).

RESUMO

Este estudo investigou o efeito de diferentes tempos de fermentação da massa elaborada com a adição de erva-mate (EM) na farinha de trigo integral (FTI), e seu efeito no comportamento reológico, liberação de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Três tratamentos foram avaliados: EM1 (2,5%; m/m), EM2 (4,5%; m/m), e amostra controle (0%). O comportamento da fermentação da massa demonstrou uma alteração na produção de CO₂, e o volume da massa foi reduzido quando a erva-mate estava presente. A adição de EM na massa, juntamente com o processo de fermentação, aumentou o conteúdo fenólico livre, ligado e total, bem como a sua atividade antioxidante. A adição de 4,5% de EM aumentou o conteúdo de fenólicos livres na massa após o processo de fermentação. Um total de 26 compostos fenólicos foram identificados nas amostras de massa. A rutina foi o principal composto nas massas com EM, compreendendo 79% e 61% do total de compostos fenólicos da EM2 e EM1, respectivamente. O perfil fenólico demonstrou que a os tempos de fermentação de 30 e 60 minutos liberaram maior quantidade de compostos nas três massas estudadas, principalmente o ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, isoquercetina e rutina. Estes resultados sugerem que o processo de fermentação da massa pode ser um fator determinante para a liberação de compostos fenólicos.

Palavras-chave: produtos de panificação, compostos bioativos, comportamento fermentativo, *Ilex paraguariensis*, farinha de trigo integral.

ABSTRACT

This study investigated the effect of different fermentation times of dough made with whole wheat flour (WWF) added with yerba mate (YM), and the effect on rheological behavior, release of phenolic compounds, and antioxidant activity. Three treatments were evaluated: YM1 (2.5%; w/w), YM2 (4.5%; w/w), and the control sample (0%). The dough fermentative behavior showed an alteration in CO₂ production, and dough volume was reduced in the presence of YM. The addition of YM, together with the fermentation process, increased the free, bound, and total phenolic content, as well as the antioxidant activity of the dough. The addition of 4.5% of YM showed higher content for free phenolic compounds on the dough after the fermentation. 26 phenolic compounds were identified in the dough samples. Rutin was the main compound in doughs with YM, comprising 79% and 61% of total phenolic content of YM2 and YM1, respectively. The phenolic profile demonstrated that fermentation times of 30 and 60 min released greater amounts of compounds in the three studied doughs, mostly caffeic acid, ferulic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, isoquercetin, and rutin. These results suggest that the dough fermentation process may be a determining factor for the release of phenolic compounds.

Keywords: bakery products, bioactive compounds, fermentation behavior, *Ilex paraguariensis*, whole wheat flour.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, pesquisas têm demonstrado o potencial de plantas como fontes de compostos bioativos para a produção de alimentos funcionais e nutracêuticos, ou seja, alimentos que proporcionam tanto nutrição básica e benefício à saúde, quanto redução do risco de doenças crônicas (SANTINI; NOVELLINO, 2018). Por exemplo, *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., também conhecida como erva-mate (EM), tem sido amplamente consumida em diversos países da América do Sul, principalmente na forma de bebida, mas também como antioxidante natural em alguns produtos formulados industrialmente. A planta é conhecida por conter propriedades farmacológicas, incluindo atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (BRACESCO *et al.*, 2011; FERRARIO *et al.*, 2018). As propriedades benéficas da erva-mate estão associadas principalmente ao elevado conteúdo de compostos fenólicos, encontrados predominantemente em suas folhas (FERRARIO *et al.*, 2018).

Diversos estudos relataram a incorporação de polifenóis de diferentes fontes de plantas em produtos de panificação, como pães, bolos e biscoitos, objetivando melhorar as suas propriedades funcionais (GÓMEZ; MARTINEZ, 2018; OU *et al.*, 2019). No entanto, é conhecido que estes compostos são muito reativos e sensíveis ao processamento, podendo também interagir com as matérias-primas e compostos que são formados durante o processo de mistura, fermentação e cozimento.

A farinha de trigo integral (FTI) é uma alternativa para a indústria de panificação, pois possui alto teor de fibras alimentares e micronutrientes importantes, como as vitaminas e antioxidantes (CAPPELLI *et al.*, 2019). Na produção de pães, as características do produto final dependem da qualidade e do processamento da farinha, uma vez que os componentes presentes na massa podem ser alterados. Além disso, o processo fermentativo pode levar a modificações nas características tecnológicas e funcionais do produto final (DYNKOWSKA *et al.*, 2015). Alguns estudos indicam que as propriedades antioxidantes dos pães podem ser melhoradas, aumentando o conteúdo de ácidos fenólicos livres durante o processo de fermentação (RANI *et al.*, 2018; ANTOGNONI *et al.*, 2019), embora estudos semelhantes tenham mostrado efeitos contrários (HAN; KOH, 2011; CHLOPICKA *et al.*, 2012).

Um estudo conduzido por Rani *et al.* (2018) demonstrou que o processo de fermentação da massa leva ao aumento de aminoácidos livres, minerais e polifenóis. Da mesma forma, Verardo *et al.* (2018) demonstraram que a mistura da massa e a

fermentação facilitou a liberação de compostos fenólicos livres. Assim, a fermentação pode auxiliar na liberação de compostos fenólicos na massa, tanto da erva-mate quanto da FTI.

Estudos sobre a disponibilidade e a liberação de compostos fenólicos durante o processo de fermentação da massa elaborada com a adição de erva-mate são inexistentes. Ademais, é necessário o entendimento de como estes compostos podem ser liberados durante o processo. Nesse contexto, a massa de farinha de trigo integral incorporada de erva-mate em diferentes proporções foi preparada e o comportamento da fermentação foi avaliado a fim de evidenciar possíveis alterações na sua capacidade em alterar o conteúdo fitoquímico da massa. Os compostos fenólicos e a distribuição relativa na forma total, livre e ligada, bem como a capacidade antioxidante foram avaliadas nas massas, visando selecionar o melhor desempenho do processo fermentativo em termos do conteúdo fitoquímico, para posterior utilização em produtos funcionais de panificação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Os grãos de trigo (*Triticum aestivum* L) provenientes da cultivar Toruk, safra 2017/18 foram fornecidos pela empresa Biotrigo Genética-Ltda (Passo Fundo, Brazil). As folhas de erva-mate da safra 2017 foram fornecidas pela empresa Inovamate (Ilópolis, Brazil). Os reagentes químicos foram de grau analítico. Etanol, n-hexano, acetato de etila, hidróxido de sódio (NaOH), e ácido clorídrico (HCl) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os padrões analíticos (pureza $\geq 95\%$) de apigenina, isorhamnetina, pinobanksina, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido *p*-aminobenzoico, ácido *p*-cumárico, 4-metilumbeliferona, ácido vanílico, rutina, naringina, (+) -catequina, sinapaldeído, ácido cafeico, ácido clorogênico, coniferaldeído, siringaldeído, crisina, hesperidina, ácido siringico, kaempferol, naringenina, galato de (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina, pinocebrina, galangina, ácido salicílico, quercetina, ácido gálico, ácido benzoico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico e luteolina foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Dimetilsulfóxido de grau HPLC (DMSO), metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o ácido fórmico (AF) de grau HPLC foi adquirido da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). A água ultrapura foi obtida de um sistema de purificação de água Megapurity (Billerica, MA, EUA). As soluções padrão de cada composto foram preparadas dissolvendo 10 mg de padrão analítico, com as seguintes exceções: isorhamnetina (12,5 mg) e pinobanksina (11,5 mg) que foram dissolvidas em 10 mL de metanol, enquanto que a hesperidina foi dissolvida em 10 mL de DMSO (dimetilsulfóxido). Todas as soluções foram armazenadas a 4 ± 2 °C. Uma solução intermediária contendo todos os compostos padrão (1 $\mu\text{g/mL}$) foi preparado em metanol.

2.2 Processamento da farinha de trigo integral e das folhas de erva-mate

Os grãos de trigo foram moídos em moinho experimental (CD1, Chopin, França) para obtenção da farinha refinada de trigo. Posteriormente, o farelo e o germe foram peneirados em peneira de 600 μm (30 mesh) e reincorporados completamente na farinha refinada para a obtenção da farinha de trigo integral (FTI), com tamanho de partícula de 537,8 μm . As folhas de erva-mate (EM) (*Ilex paraguariensis* St. Hil) foram branqueadas pela imersão em água na temperatura de 95 ± 2 °C durante 30 segundos e secas em estufa

de circulação de ar forçada em temperatura de 45 ± 2 °C por 24 horas. As folhas foram moídas em moinho de facas (Marconi, M048, Brasil) e peneiradas para a obtenção do tamanho de partícula de 245 μm . O apêndice B (Tabela 1) apresenta a composição química da EM e FTI.

As amostras experimentais foram preparadas com a incorporação de erva-mate na farinha de trigo integral (g EM/100 g FTI, m/m) em duas diferentes proporções. Três tratamentos foram preparados: EM1 (2,5%; m/m), EM2 (4,5%; m/m) e FTI (controle) (0%; m/m). A proporção de erva-mate foi estabelecida de acordo com estudos anteriores (FAKHFAKH *et al.*, 2017; NING *et al.*, 2017; BOUREKOUA *et al.*, 2018) e testes preliminares.

2.3 Comportamento da massa durante a fermentação

O reofermentômetro (F4, Chopin Technologies, França) foi utilizado para avaliar as características da fermentação da massa elaborada pela incorporação de EM. As massas foram preparadas de acordo com o método nº 89-01.01 (AACCI, 2010), utilizando um Alveógrafo (Chopin Technologies, França). Para o teste foram utilizados 250 g da farinha de cada tratamento (EM1, EM2 e FTI), 1 g de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*; Fleischmann) e a água foi adicionada de acordo com a absorção de água obtida no teste de Farinografia (APÊNDICE B, Tabela 2). A massa foi misturada durante 8 minutos e então transferida (315 g) para o cesto do reofermentômetro com 4 pistões de 2 kg cada. O teste foi realizado a 28 ± 2 °C durante o período de 3 horas. Os parâmetros reológicos de fermentação analisados foram: H_m (mm): altura máxima da massa durante 3 horas de fermentação; h (mm): altura da massa ao final de 3 horas de fermentação; $H_m - h/H_m$: queda percentual no desenvolvimento da massa após 3 horas de fermentação; H'_m : altura máxima de liberação de gás; V_t : volume total do gás produzido durante 3 horas de fermentação; $R\%$ (VR/V_t): coeficiente de retenção de gás (a porcentagem do volume de retenção em relação ao volume total de gás).

2.4 Elaboração da massa em diferentes tempos de fermentação

A elaboração das massas para o processo de fermentação foi realizada utilizando um teste instrumental de panificação em pequena escala descrito por Bressiani *et al.* (2017). As massas foram divididas manualmente em porções de 30 g, e o processo de

fermentação foi realizado utilizando uma câmara (MP20, Multipão, Brasil) a 30 ± 2 °C e 80% de umidade relativa. Os tempos de fermentação aplicados foram de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. Ao final de cada tempo a massa foi imediatamente levada ao ultra freezer. As massas foram liofilizadas (48 horas) e moídas até passar através de uma peneira de 30 mesh para posterior análises.

2.4.1 Extração e determinação de compostos fenólicos livres e ligados das massas após diferentes tempos de fermentação

Para a extração dos fenólicos livres foi seguido o método descrito por Dinelli *et al.* (2011), enquanto que a extração dos fenólicos ligados foi realizada utilizando o mesmo protocolo, mas com algumas modificações. O resíduo obtido na extração de fenólicos livres foi utilizado para obtenção dos fenólicos ligados. O resíduo foi desengordurado com 10 mL de hexano (5500 rpm, 10 minutos) e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, uma hidrólise alcalina foi realizada no escuro durante 22 horas em temperatura ambiente, pela adição de 34 mL NaOH 4 mol/L sob agitação constante. O pH foi ajustado para 2,0 com a adição de HCl. A extração foi realizada com 15 mL de acetato de etila, seguido de centrifugação a $2,500 \times g$ por 5 minutos a temperatura de 10 ± 2 °C. O sobrenadante foi coletado e o resíduo foi extraído por mais duas vezes. Os sobrenadantes foram combinados para cada amostra, secos em estufa a 35 ± 2 °C, e ressuspensos em 10 mL de etanol 80%. Ao final da hidrólise alcalina, uma hidrólise ácida foi realizada pela adição de 2,5 mL de HCl concentrado no resíduo obtido mantido em banho maria (85 ± 2 °C por 30 minutos). Após o resfriamento, o mesmo processo de extração com acetato de etila foi realizado. Os extratos foram filtrados e armazenados a -20 ± 2 °C até a realização das análises.

Os compostos fenólicos livres, ligados e totais foram determinados utilizando o reagente Folin-Cioacalteu (SINGLETON *et al.*, 1999). A quantificação foi baseada em uma curva padrão de ácido gálico ($y = 0,0161x + 0,0133$; $R^2 = 0,9953$) e os resultados expressos em mg ácido gálico equivalente por 100 g de amostra, em base seca (mg AGE/100 g).

2.4.2 Capacidade antioxidante das massas após diferentes tempos de fermentação

A capacidade antioxidante das massas em diferentes tempos de fermentação foi avaliada de acordo com dois métodos: ABTS e FRAP. O ensaio do radical ABTS foi determinado de acordo com Re *et al.* (1999), e o potencial antioxidante redutor férrico foi determinado pelo ensaio de FRAP utilizando o método estabelecido por Benzie e Strain (1996). Os resultados foram expressos em μmol Trolox equivalente por grama de amostra, em base seca ($\mu\text{mol}/\text{Trolox g}$).

2.4.3 Análise LC-MS/MS do perfil fenólico da erva-mate e das massas após diferentes tempos de fermentação

O perfil dos compostos fenólicos da erva-mate e das massas foi determinado de acordo com o procedimento descrito por Seraglio *et al.* (2016). As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem por ionização por eletro pulverização (LC-ESI-MS/MS), em um sistema cromatográfico Agilent série 1290 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EUA), acoplado a um espectrômetro de massa híbrido quadrupolo com armadilha de íons linear quadrupolo QTRAP® 5500 (Sciex, Foster City, CA, EUA) equipado com uma fonte de ionização por eletro pulverização (ESI). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna VENUSIL C18 (100 mm \times 2,1 mm; 3 μm diâmetro de partícula; Bona Angela Technologies, Wilmington, DE, EUA). A vazão utilizada foi de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, e um volume de 5 μL foi injetado para todas as soluções padrão e amostras. A fase móvel continha o solvente A (água com 0,1% AF) e o solvente B (ACN com 0,1% de FA). O gradiente da fase móvel foi programado da seguinte forma: 98% A (v/v) de 0 a 4,0 minutos, 98–80% A (v/v) de 4,0–7,0 minutos, 80–10% A (v/v) de 7,0–14,0 minutos, 10% A (v/v) de 14,0–15,0 min, 10–98% A (v/v) de 15,0–17,0 minutos. O tempo total da corrida foi de 17 minutos, e o tempo de equilíbrio da coluna entre cada corrida foi de 4 minutos. A coluna foi mantida a 40 °C. A análise de espectrometria de massa foi realizada no modo MRM com os seguintes parâmetros: voltagem do íon spray (IS): 5500 V; gás 25 psi; gás nebulizador (GS1) e gás auxiliar (GS2): 55 psi; temperatura da fonte: 400 °C. O nitrogênio foi utilizado como nebulizador e gás de colisão. O Apêndice B (Tabela 3) apresenta os parâmetros específicos dos analitos otimizados por meio de infusão direta de soluções padrão para cada composto. O software Analyst 1.6.2 (Sciex, Foster City,

CA) foi utilizado para aquisição e processamento dos dados. A quantificação de cada composto foi realizada em triplicata por calibração externa. O desempenho do método foi compatível com os parâmetros de validação relatados anteriormente (SERAGLIO *et al.*, 2016).

2.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) em um delineamento experimental completamente casualizado para avaliar a reologia da fermentação da massa, compostos fenólicos e atividade antioxidante em um intervalo de confiança de 95%. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o software SASM-Agri versão 8.2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Comportamento fermentativo da massa elaborada com folhas de erva-mate

As propriedades de massa durante a etapa de fermentação estão apresentadas na Tabela 1. Quando comparado com a massa controle (FTI), o desenvolvimento da massa (H_m e h) diminuiu significativamente ($p < 0,05$) conforme a erva-mate foi adicionada. Isso ocorreu porque a EM pode ter interrompido a matriz amido-glúten e restringido a extensão da massa durante o processo de fermentação, afetando o comportamento visco-elástico e a liberação de gás na massa (LIU *et al.*, 2016), como observado para a estabilidade da massa (APÊNDICE B, Tabela 2)

Tabela 1. Efeito das folhas de erva-mate na massa de pão analisada pelo reofermentômetro F4.

Parâmetros	Amostras		
	FTI (controle)	EM1	EM2
Desenvolvimento da massa *			
H _m (mm)	35,65 ± 0,85 ^a	21,00 ± 0,60 ^b	21,35 ± 0,15 ^b
h (mm)	32,00 ± 0,50 ^a	25,00 ± 0,10 ^c	21,35 ± 0,15 ^b
(H _m - h) / H _m (%)	8,00 ± 0,00 ^a	0,01 ± 0,01 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
Comportamento do gás **			
H' _m (mm)	67,85 ± 0,35 ^a	18,00 ± 1,00 ^b	15,50 ± 0,50 ^c
V _t (mL)	1509,50 ± 8,50 ^a	357,00 ± 4,00 ^b	316,00 ± 2,00 ^c
R (%)	75,90 ± 0,30 ^b	99,35 ± 0,05 ^a	99,65 ± 0,05 ^a

Resultados foram expressos como média e desvio padrão (n=2). Letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p<0,05), submetidos ao teste de Tukey. FTI: farinha de trigo integral. EM1: 2,5 g EM/100 g FTI. EM2: 4,5 g EM/100 g FTI.

*H_m: altura máxima da massa durante as 3 horas de fermentação. *h: altura da massa ao final de 3 horas de fermentação. *(H_m - h)/H_m (%): queda percentual da massa após 3 horas de fermentação. **H'_m: altura máxima da liberação de gás. **V_t: volume total produzido durante 3 horas de fermentação. **R: coeficiente de retenção de gás (a porcentagem de retenção do volume em relação ao volume total).

Durante todo o processo de fermentação o gás produzido pela atividade da levedura se difunde na massa e aumenta o número de bolhas de ar durante o processo de mistura. A relação existente entre a produção e retenção do dióxido de carbono é expressa como a porcentagem de gás que é retido na massa (LIU *et al.*, 2016; FARBO *et al.*, 2020), onde um valor baixo de (H_m-h) / H_m indica maior estabilidade entre os espaços porosos da massa.

Observou-se que as propriedades de fermentação relacionadas com a liberação de gás foram influenciadas diretamente pela adição de EM. O gás liberado durante o processo fermentativo (H'_m) nas amostras foi reduzido (p<0,05) conforme o aumento da concentração das folhas de erva mate. Isso pode estar relacionado com a estabilidade da massa durante o processo, uma vez que se manteve constante e não liberou o CO₂ durante as 3 h de fermentação (APENDICE B, Figura 1 (b; c)). Ainda, essa diferença na liberação de gás pode ter ocorrido devido a maior exposição de amido na massa controle (FTI) quando comparada com as amostras contendo erva mate, o que propiciou a maior atividade da levedura frente aos açúcares disponíveis para a produção de gás (WU *et al.*, 2019).

De acordo com Rubio *et al.* (2019), quando as células de leveduras sofrem modificações físicas ou químicas extremas (como mistura e ligações com compostos fenólicos), podem apresentar diferentes propriedades quando comparadas com a levedura original. Em vista disso, a presença de fitoquímicos na massa pode ter levado a formação de complexos com a estrutura da levedura, provocando conseqüentemente, a diminuição da sua atividade frente a produção de CO₂ na massa.

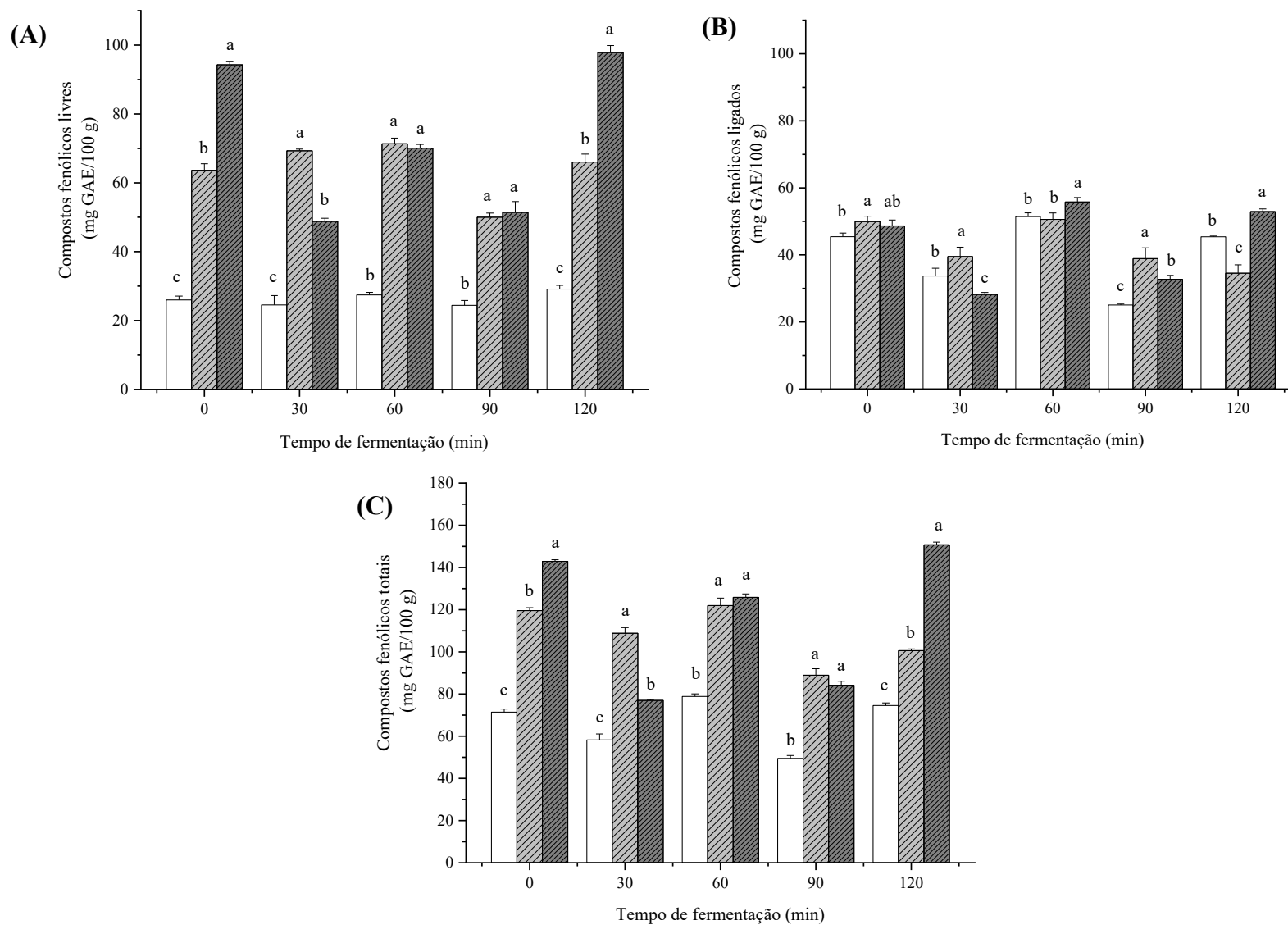
O volume total (V_t) de gás produzido pela massa controle foi maior (p<0,05) que o das outras duas massas elaboradas com EM. Este menor volume observado nas amostras EM1 e EM2 pode estar relacionado à estabilidade observada no desenvolvimento da massa, em que de alguma forma a massa prendeu os gases produzidos durante o processo, evitando que os mesmos pudessem ser expandidos. Marti *et al.* (2015) indicaram que a expansão da massa é assegurada através da formação progressiva do CO₂. Em nosso estudo, os gases produzidos nas amostras contendo EM provavelmente se mantiveram presos na estrutura proteica, evitando que pudessem ser expandidos de forma significativa, como ocorreu na massa controle (FTI). Além disso, a redução do volume pode ser devido a liberação de substâncias reativas, como os compostos fenólicos, durante o processo fermentativo. Alguns compostos podem romper a matriz amido-glúten quando são adicionados na massa, fazendo com o que as células gasosas se expandam a uma direção não específica, resultando em uma massa não uniforme. Isso pode afetar profundamente a capacidade da massa em expandir e reter os gases produzidos (XU *et al.*, 2018).

A capacidade de retenção de gás é fundamental para o desenvolvimento da massa, uma vez que não afeta apenas a quantidade de gás produzido e perdido na matriz do glúten, mas também a qualidade do produto final (HACKENBERG *et al.*, 2017). A igualdade observada no parâmetro R (%) sugere que a EM pode ter auxiliado na estrutura da massa no que se refere a retenção de gás. Isso porque foi verificada uma desaceleração da produção de CO₂, tornando-a gradual e retida com maior facilidade pela rede de glúten (H'_m) (APÊNDICE B, Figura 1). Esses resultados suportam a ideia de que o uso da EM pode ser uma alternativa para melhorar a funcionalidade da massa pela presença de diversos fitoquímicos, uma vez que possíveis interações entre as proteínas e os fenólicos através de ligações covalentes e/ou não-covalentes, podem interferir nas propriedades físico-químicas e reológicas da massa, e, conseqüentemente, no processo de fermentação (OZDAL *et al.*, 2013).

3.2 Compostos fenólicos livres, ligados e totais das massas elaboradas com erva-mate após os diferentes tempos de fermentação

A Figura 1 apresenta o teor de fenólicos livres, ligados e totais das massas após os diferentes estágios do processo de fermentação. O conteúdo de fenólicos livres da massa controle (FTI) variou entre 24,43 e 29,14 mg de GAE/100 g. Como já esperado, a massa controle apresentou menor conteúdo de fenólicos livres ($p < 0,05$) do que as massas elaboradas com a incorporação de EM. A adição de 4,5 g EM/100 g FTI promoveu os melhores resultados após a fermentação. A fermentação, na sua quase totalidade, aumentou ou manteve o teor de compostos fenólicos livres, independente da massa analisada. Apenas no tempo de fermentação de 30 minutos foi verificada uma queda para a massa de maior incorporação de EM (EM2).

Figura 1. Conteúdo fenólico livre (A), ligado (B), e total (C) das massas elaboradas pela incorporação de erva-mate na farinha de trigo integral após os diferentes tempos de fermentação.



Cada valor é apresentado como média \pm desvio padrão ($n=3$). Letras diferentes diferem estatisticamente ($p<0,05$) das amostras no mesmo tempo de fermentação, pelo teste de Tukey. FTI: Farinha de trigo integral (controle) . EM1: 2,5 g EM/100 g FTI . EM2: 4,5 g EM/100 g FTI .

Em relação ao conteúdo de compostos fenólicos ligados, observou-se uma redução devido ao aumento do conteúdo fenólico livre após a fermentação para todas as massas analisadas. Além disso, foi possível verificar que o tempo de fermentação de 30 minutos apresentou as melhores porcentagens de redução quando comparado ao tempo total de fermentação de 120 minutos.

Durante a mistura algumas enzimas intrínsecas podem ser ativadas com a adição da água, bem como os compostos fenólicos podem ser parcialmente decompostos a partir do efeito de cisalhamento mecânico. É sabido que ácidos fenólicos simples e flavonóides geralmente ocorrem como formas conjugadas (glicosídeos) e ligadas (NARDINI; GHISELLI, 2004). Sendo assim, o aumento do conteúdo fenólico livre provavelmente ocorreu devido à ação de enzimas endógenas e microbianas durante a fermentação, o que levou a liberação de alguns compostos fenólicos ligados para as suas formas livres (AJILA *et al.*, 2011; JAMAL *et al.*, 2011). Tian e colaboradores (2021) reportaram que durante o processo de fermentação a atividade da levedura pode degradar parcialmente o complexo fenólico-carboidrato, levando ao aumento do conteúdo de ácidos fenólicos livres. Por outro lado, o metabolismo da levedura pode consumir os ácidos fenólicos ou transferir fenólicos específicos para outros compostos da matriz.

O maior aumento do conteúdo fenólico total foi obtido após o tempo de 60 minutos para FTI e EM1, enquanto que para EM2 foi no tempo de 120 minutos. Esses resultados mostram claramente a importância da fermentação no aumento do conteúdo fenólico. Foi possível observar também, que conforme esperado, a maior incorporação de EM resultou em resultados mais altos de conteúdo fenólico total. Yu e Beta (2015) também relataram um aumento no conteúdo fenólico total após o processo de fermentação, e atribuíram este fenômeno à liberação de fenólicos ligados da parede celular dos grãos. Em nosso estudo, os compostos fenólicos das duas matrizes, FTI e EM, estão localizadas principalmente na parede celular, ligadas a hemiceluloses ou outros constituintes da parede.

Em vista disso, o tempo de fermentação de 30 minutos (o mais próximo do ideal para a produção de pães) seria suficiente para a amostra EM1 em relação ao conteúdo de fenólicos livres, ligados e totais da massa. Contudo, a utilização do tempo de fermentação de 60 minutos seria mais efetiva para a amostra EM2, aumentando os valores de compostos fenólicos livres, ligados e totais da massa. Estes resultados podem auxiliar na produção de diferentes pães, uma vez que o tempo de fermentação não é padrão para alguns produtos panificáveis. Alguns trabalhos mencionam que um maior tempo de

fermentação (2–3 horas) pode favorecer o produto no que diz respeito a atributos nutricionais e funcionais (MOORE *et al.*, 2009; RANI *et al.* 2018).

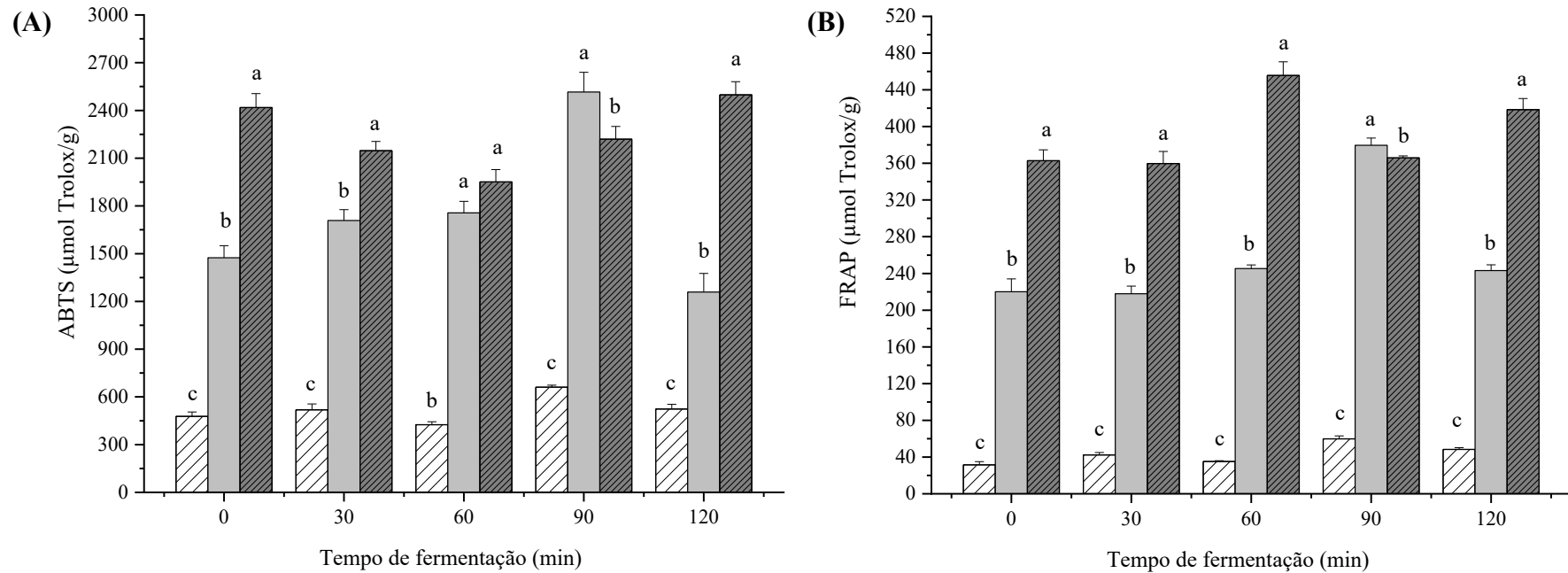
3.3 Efeito de diferentes tempos de fermentação nas propriedades antioxidantes das massas




Os valores das atividades antioxidantes das massas em diferentes tempos de fermentação estão dispostos na Figura 2. No tempo 0 de fermentação a massa que expressou maior atividade antioxidante, tanto por ABTS quanto pelo potencial redutor férrico (FRAP) foi a EM2, seguido da EM1 e FTI (controle). A elevada atividade antioxidante é diretamente proporcional a erva-mate que foi adicionada à massa (BRACESCO *et al.*, 2011).

Ao longo do processo de fermentação, as massas apresentaram diferentes comportamentos. A massa controle (FTI) apresentou constância nos diferentes tempos, para as atividades antioxidantes avaliadas pelos dois ensaios; ao contrário de EM1, que obteve um aumento gradual, com um pico de atividade antioxidante no tempo 90 minutos para ABTS (2550 $\mu\text{mol Trolox/g}$) e FRAP (380 $\mu\text{mol Trolox/g}$). A incorporação de EM na massa pode explicar o aumento do potencial antioxidante nas duas amostras EM1 e EM2, uma vez que a EM apresenta níveis significativos de compostos fenólicos complexados e livres, que podem ser liberados durante a fermentação.

Segundo Chi and Cho (2016), a fermentação modifica a estrutura da farinha decorrente da ação de enzimas, como glucosidases e celulasas, hidrolisando e liberando compostos que estão complexados, como compostos fenólicos e peptídeos de baixo peso molecular, que contribuem para o aumento da atividade antioxidante. Já o decaimento da atividade antioxidante para a massa EM1 no tempo máximo de fermentação (120 minutos) pode ser explicado pela síntese de diversas enzimas - pelos microrganismos presentes – que são capazes de hidrolisar fenóis e outros componentes inibidores de radicais livres, o que conseqüentemente diminui a atividade antioxidante (OTHMAN *et al.*, 2009).

Figura 2. Capacidade antioxidante das massas elaboradas pela incorporação de erva-mate na farinha de trigo integral após os diferentes tempos de fermentação



Cada valor é apresentado como média \pm desvio padrão ($n=3$). Letras diferentes diferem estatisticamente ($p<0,05$) das amostras no mesmo tempo de fermentação, pelo teste de Tukey. FTI: Farinha de trigo integral (controle) . EM1: 2,5 g EM/100 g FTI . EM2: 4,5 g EM/100 g FTI .

No ensaio de ABTS (Figura 2A), a amostra EM2 teve um pico de atividade no tempo 0 e em 120 minutos de fermentação (~ 2400 $\mu\text{mol/Trolox g}$, em ambos), com um leve decréscimo entre estes tempos. Isso pode ser relacionado às ações enzimáticas e liberação de compostos, ainda complexados, com menor atividade antioxidante entre os tempos 30 e 90 minutos. Contudo, com o decorrer do tempo, a provável liberação de compostos de menor peso molecular como peptídeos bioativos e açúcares redutores, além de metabólitos secundários dos microrganismos (HUR *et al.*, 2014), pode ter gerado o pico de maior potencial de inibição de radicais livres no tempo 120 minutos de fermentação.

Mateo-Anson *et al.* (2011) estudaram o processamento do farelo de trigo para a obtenção de pães e evidenciaram que a fermentação por leveduras, juntamente com enzimas como celulase, xilanases, ferroililesterases e beta-glucanases, que hidrolisavam a parede celular, aumentaram significativamente a biodisponibilidade de ácidos fenólicos e seus metabólitos secundários. Com isto, nossos resultados demonstram claramente o aumento da atividade antioxidante em função da fermentação e adição de erva-mate nas massas, e isso corrobora e converge sobre o indicativo de potencial benefício ao consumo humano.

3.4 Perfil fenólico das massas elaboradas com erva-mate nos diferentes tempos de fermentação

A Tabela 2 apresenta o perfil fenólico das massas em diferentes tempos de fermentação. Embora 38 compostos tenham sido analisados (APÊNDICE B, Tabela 3), um total de 26 compostos foram identificados nas massas da FTI, EM1 e EM2. Para as três amostras estudadas nos diferentes tempos de fermentação, foi possível identificar fitoquímicos de diferentes classes, incluindo ácidos fenólicos e derivados, flavonoides e derivados, e fenóis em geral.

Foi possível observar nas três massas (FTI, EM1 e EM2) que 17 compostos fenólicos foram predominantes nos diferentes tempos de fermentação, sendo que os principais identificados foram o ácido ferúlico, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, isoquercetina e rutina. Estes compostos apresentaram concentrações elevadas nos tempos de fermentação de 30 e 90 minutos (Figura 3), que de acordo com a *American Association of Cereal Chemists International* são considerados os tempos de fermentação mais efetivos para pães (AACC 2010). As massas FTI e EM1 apresentaram

maior quantidade de fenólicos identificados no tempo de 60 minutos, enquanto que na massa EM2 isto ocorreu depois de 30 minutos.

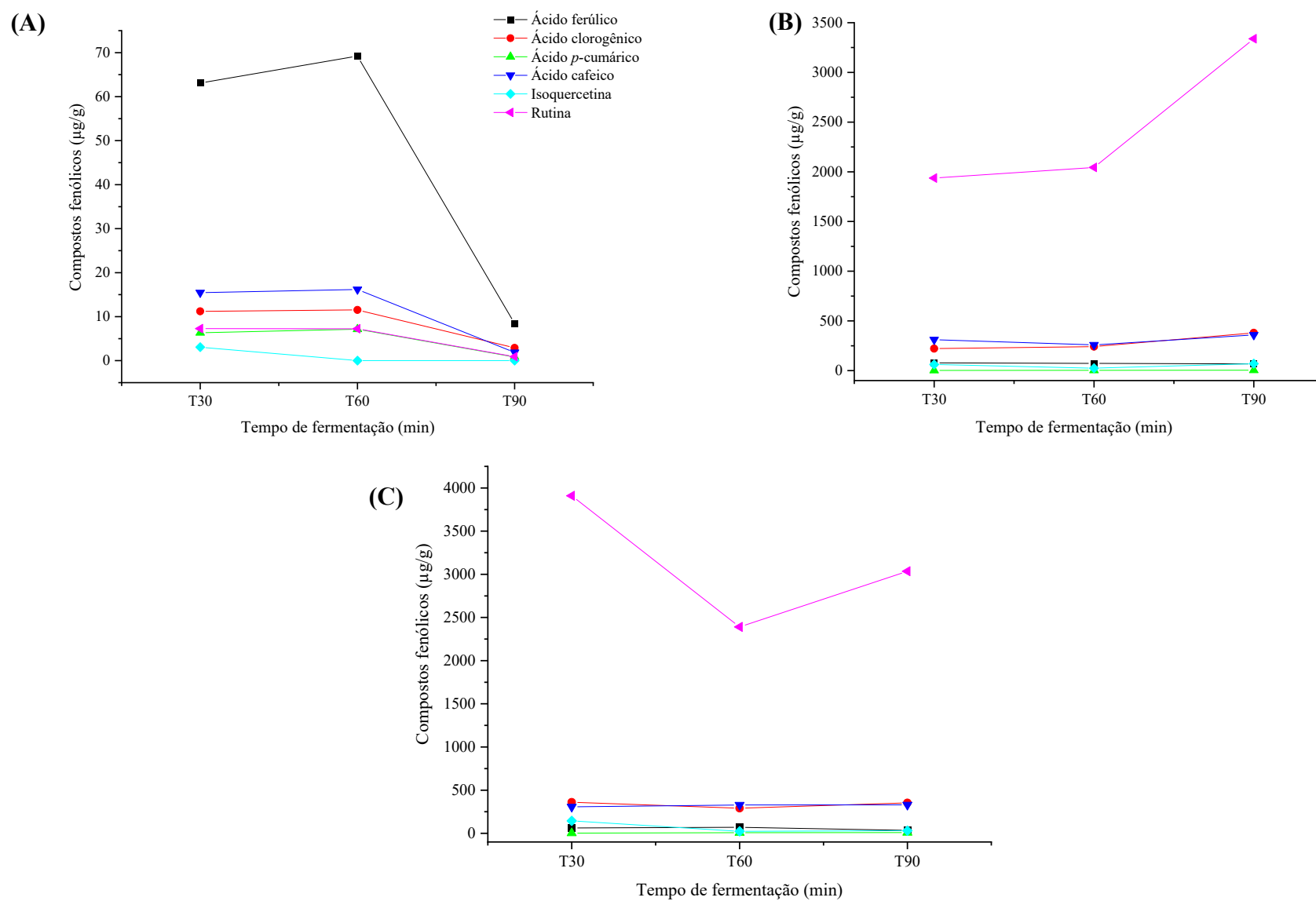
Tabela 2. Perfil fenólico das massas de pães elaborados com a adição de erva-mate na farinha de trigo integral após diferentes tempos de fermentação.

Compostos fenólicos (µg/g)	Tempo de fermentação (min)														
	Massa FTI					Massa EM1 (m/m)					Massa EM2 (m/m)				
	T 0	T 30	T 60	T 90	T 120	T 0	T 30	T 60	T 90	T 120	T 0	T 30	T 60	T 90	T 120
Ácido benzoico	2,14	1,54	0,87	0,12	0,06	1,78	1,10	1,86	1,20	0,59	1,33	1,22	0,76	0,28	0,03
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	5,59	7,13	5,30	0,80	0,58	6,45	5,42	6,93	5,10	5,49	7,50	5,43	5,90	5,36	6,51
Ácido ferúlico	93,42	63,09	69,22	8,54	8,22	56,34	77,51	72,83	67,99	96,89	50,66	62,84	69,92	33,79	58,59
Ácido siríngico	1,19	1,46	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Pinocembrina	2,39	2,59	2,05	0,30	0,35	2,98	3,83	4,25	5,51	6,58	3,85	3,78	6,27	6,43	9,65
Ácido elágico	52,52	163,14	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Ácido clorogênico	14,34	11,21	11,52	2,91	0,18	214,65	221,13	241,05	379,96	208,76	370,43	360,77	290,43	353,34	415,29
Hesperidina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	540,12	424,32	541,25	47,82	585,32	8,72	<LOQ	539,93	<LOQ	<LOQ
2,5-DHBA (2,5 – ácido diidroxibenzoico)	13,21	13,22	9,78	0,96	0,95	19,92	21,79	16,54	22,50	14,53	31,81	27,05	16,31	16,57	20,42
2,4-DHBA (2,4 – ácido diidroxibenzoico)	378,30	10,86	177,10	18,82	48,74	18,45	18,21	15,55	21,89	12,88	17,68	25,72	15,72	14,02	17,80
Luteolina	n.d	9,46	20,55	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
3,4- ácido diidroxibenzoico	4,19	4,86	4,55	0,60	0,59	5,61	7,62	9,68	10,60	12,89	6,74	8,25	12,06	12,78	16,54
Ácido <i>p</i> -cumárico	6,79	6,34	7,15	0,84	0,90	6,22	2,25	3,03	4,45	18,91	5,38	2,85	7,62	8,96	18,05

Ácido gálico	1,33	1,84	1,45	0,14	0,15	1,38	1,31	1,41	1,59	1,37	1,22	1,34	1,46	1,44	1,83
Coniferaldeído	0,55	n.d	<LOQ	n.d	n.d	<LOQ	<LOQ	n.d	0,58	n.d	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d	n.d
Ácido cafeico	18,94	15,45	16,17	1,87	2,08	143,75	311,38	258,27	385,33	484,57	116,18	307,03	328,75	329,80	403,35
Sinapaldeído	2,86	2,82	n.d	0,28	0,28	2,87	2,84	2,85	2,82	2,84	2,91	2,85	2,80	2,82	2,83
3,5-Cloreto de ácido dinitrobenzoico	n.d	<LOQ	n.d	<LOQ	<LOQ	n.d	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d	n.d	n.d	<LOQ	<LOQ
Ácido sináptico	3,81	2,86	3,81	0,30	0,30	2,51	2,68	3,01	3,02	2,22	2,72	<LOQ	2,55	2,90	2,85
Pinobanksina	0,67	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,35
Quercetina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	11,10	42,01	63,84	101,74	98,79	23,04	65,69	99,01	112,93	138,07
Isorhamnetina	<LOQ	n.d	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,12	2,46	4,18	4,62	0,32	2,06	4,61	5,62	7,80
Galato de epigallocatequina	3,39	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	3,37	2,98	3,24	3,32	n.d	n.d	n.d	n.d
Isoquercetina	3,24	3,06	n.d	n.d	0,31	112,03	61,44	24,28	69,65	15,33	285,37	144,68	23,46	30,44	20,64
Naringina	n.d	4,50	4,55	0,45	0,45	4,54	4,50	4,51	4,55	4,50	4,52	n.d	4,54	4,60	4,52
Rutina	10,02	7,28	7,24	0,91	0,83	2189,34	1937,44	2044,16	3338,75	1855,81	4331,85	3909,56	2390,15	3034,86	3095,88

FTI: Farinha de trigo integral. EM1: 2,5 g EM/100 g FTI. EM2: 4,5 g EM/100 g FTI. <LOQ: inferior ao limite de quantificação (50 µg/mL). n.d: não detectado.

Figura 3. Principais compostos fenólicos identificados nas massas nos tempos de fermentação de 30, 60 e 90 minutos na FTI (a), EM1 (b) e EM2 (c)



FTI: Farinha de trigo integral (controle). EM1: 2,5 g EM/100 g FTI. EM2: 4,5 g EM/100 g FTI.

Treze compostos fenólicos foram identificados nas amostras de massa controle (FTI), sendo o ácido 2,4 dihidroxibenzoico (2,4 DHBA) o principal composto presente representando 52% (177,1 µg/100 g) dos fenólicos totais, seguido do ácido ferúlico com 20% (69,22 µg/100 g). Essa representatividade pode ser justificada pela forma conjugada de glicosil desse composto, que foi possivelmente modificada pela ação das leveduras da massa (ALVES; PERRONE, 2015). Já o ácido ferúlico é considerado majoritário em produtos derivados do trigo, além de estar presente em sementes, folhas e farelos de cereais (OU *et al.*, 2019). As alterações na sua composição fenólica durante a fermentação da massa podem ser decorrentes da hidrólise enzimática do ácido ferúlico conjugado insolúvel, ocasionada pela ação de enzimas produzidas pelas leveduras presentes na massa (MOORE *et al.*, 2009). Além disso, fatores ambientais e genéticos podem afetar o rendimento de ácidos fenólicos no trigo (RANJBAR *et al.*, 2019).

As massas EM1 e EM2 apresentaram entre 16 e 20 compostos fenólicos, respectivamente. Para a amostra EM1, rutina, hesperidina e ácido cafeico foram os principais compostos encontrados, equivalendo a 61%, 16,3% e 7,8%, respectivamente. Enquanto que para a amostra EM2, rutina, ácido clorogênico e ácido cafeico foram os compostos predominantes, representando 79%, 7,3% e 6,2%, respectivamente. Os compostos encontrados nas massas são considerados majoritários das folhas de erva-mate. A Tabela 3 apresenta o perfil fenólico da erva-mate utilizada na elaboração das massas, no qual um total de 20 compostos fenólicos foram identificados. Neste estudo, a rutina, ácido clorogênico, isoquercetina e hesperidina foram os que mais apareceram na erva-mate.

Tabela 3. Perfil fenólico das folhas de erva-mate

Compostos fenólicos (µg/g)	Erva-mate
Ácido benzoico	7,26 ± 0,49
Siringaldeído	1,45 ± 0,02
Ácido ferúlico	4,40 ± 0,05
Ácido siríngico	2,01 ± 0,00
Epicatequina	13,79 ± 0,01
Ácido clorogênico	2073,22 ± 11,50
Hesperidina	173,60 ± 9,55
2,5-DHBA (2,5 – ácido diidroxibenzoico)	54,43 ± 0,66
2,4-DHBA (2,4 – ácido diidroxibenzoico)	183,90 ± 4,82
Ácido salilcílico	0,51 ± 0,03
3,4 – ácido diidroxibenzoico	23,06 ± 0,01
Ácido cafeico	65,25 ± 1,47
Sinapaldeído	16,64 ± 0,02
Ácido sináptico	20,24 ± 0,00
Naringenina	14,84 ± 0,00
Quercetina	12,40 ± 0,04
Isorhamnetina	16,64 ± 0,03
Isoquercetina	762,24 ± 9,91
Rutina	13736,38 ± 172,52

Resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=3).

Os fenólicos, em sua forma livre, podem acarretar novas ligações entre as proteínas, que conseqüentemente levam a liberação de novos compostos por meio de reações de condensação. Os quininos, presentes nas folhas e caules da erva mate, podem reagir com os grupos sulfidril e amino das proteínas (OZDAL *et al.*, 2013). Com isso, a liberação destes compostos pode favorecer positivamente a funcionalidade da massa. De acordo com Tian e colaboradores (2021) alguns compostos fenólicos solúveis podem existir em alto peso molecular (APM) complexado com proteínas e carboidratos. Durante a mistura e o processo de fermentação, os polifenóis de APM foram parcialmente quebrados em polifenóis de peso molecular relativamente baixo (PMB), e por isso, os ácidos fenólicos se tornam mais acessíveis para a identificação nas massas.

A incorporação das folhas de erva-mate na FTI promoveu aumento de 873% e 1382% no conteúdo fenólico total identificado nas massas EM1 e EM2, respectivamente. A rutina foi o principal composto identificado em todas as massas, contribuindo com 79%, 61% e 2% do conteúdo fenólico total nas massas EM2, EM1 e controle (FTI), respectivamente. O alto teor de rutina nas massas com EM pode ser explicado devido a alto teor de rutina que foi encontrado na erva-mate, representando 79,62% do conteúdo fenólico total (Tabela 3).

A rutina consiste em uma molécula de quercetina glicosilada, necessitando de hidrólise para a liberação da quercetina aglicona (de ARAÚJO *et al.*, 2013). Lukšič *et al.* (2016) relataram que a adição de rutina no pão durante o processo de panificação transformou a rutina em quercetina a partir da atividade de enzimas que degradam a rutina, geralmente ativadas na amostra após a adição de água no processo de mistura. Esse composto vem sendo cada vez mais relacionado à redução do risco de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares em diversos estudos científicos.

Assim, o alto teor de rutina identificadas nas massas EM1 e EM2, juntamente com o processo de fermentação, provavelmente favoreceu a transformação de rutina em quercetina. A quercetina é um dos flavonóis mais comuns em vegetais, e possui atividade inibidora das enzimas digestivas de carboidratos incluindo α -glucosidase e α -amilase, podendo retardar a digestão do amido (LIN *et al.*, 2019).

Em geral, o processo de fermentação ocasionou um aumento na composição fenólica das amostras de massa estudadas. Uma hipótese é que formas conjugadas com glicosil dos compostos fenólicos podem ter sido liberadas diretamente pela ação de β -glicosidasas produzidas pelas leveduras (HUR *et al.*, 2014). Alternativamente, a composição fenólica das massas EM1 e EM2 foi possivelmente modificada devido a mistura e fermentação. Este fato pode ser explicado, uma vez que, diversos ácidos fenólicos em nossa pesquisa, podem ter interagido com o glúten durante o processo fermentativo, como o ácido cafeico, ácido ferulico, ácido clorogênico e ácido gálico, que se ligam via ligações covalentes (XU *et al.*, 2019). Portanto, os compostos fenólicos podem ter sido mais facilmente liberados de suas formas ligadas para suas formas livres

4. CONCLUSÃO

Em resumo, o comportamento fermentativo das massas observadas no reofermentômetro demonstrou que as folhas de erva mate influenciam na produção de

CO₂. Isso possivelmente ocorreu devido à interação de compostos fenólicos específicos como alguns ácidos fenólicos que modificam a estrutura da rede de glúten e refletem na qualidade do produto final. A adição de erva-mate favoreceu, juntamente com a ação da fermentação, o aumento expressivo do conteúdo fenólico e da atividade antioxidante da massa. Além disso, o perfil fenólico demonstrou que os melhores tempos fermentativos para a liberação de compostos ficaram entre 30 e 60 minutos. Os principais compostos identificados na FTI, EM1 e EM2 foram o ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, isoquercetina e rutina.

Por fim, esta pesquisa demonstrou claramente que o processo fermentativo de pães pode ser um fator determinante para a liberação de compostos fenólicos. Além disso, a adição de erva mate na farinha integral possibilitou o aumento na funcionalidade do pão, devido aos compostos biologicamente ativos presentes. No entanto, mais pesquisas são necessárias para explorar as reações de formação/degradação/hidrólise de compostos fenólicos durante o cozimento da massa, a fim de esclarecer o efeito da temperatura no composto fenólico individual.

REFERÊNCIAS

AACCI. American Association of Cereal Chemists International. **Approved Methods of Analysis** (11 th ed.). St Paul, MN, USA: AACC International, 2010.

AJILA, C.M. *et al.* Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* - liberation and extraction of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v.126, p.1071–1080, 2011.

ACOSTA-ESTRADA, B.A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J.A.; SERNA-SALDIVAR, S.O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v.152, p.46-55, 2014.

ALVES, G.; PERRONE, D. Breads enriched with guava flour as a tool for studying the incorporation of phenolic compounds in bread melanoidins. **Food Chemistry**, v.185, p.66-74, 2015.

ANTOIGNONI, F. *et al.* Changes in carotenoids, phenolic acids and antioxidant capacity in bread wheat doughs fermented with different lactic acid bacteria strains. **Food Chemistry**, v.292, p.211-216, 2019.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, p.70-76, 1996.

BOUREKOUA, H. *et al.* Evaluation of physical, sensorial, and antioxidant properties of gluten-free bread enriched with *Moringa Oleifera* leaf powder. **European Food Research Technology**, v.244, p.189-195, 2018.

BRACESCO, N. *et al.* Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v.136, p.378–384, 2011.

BRESSIANI, J. *et al.* Properties of whole grain wheat flour and performance in bakery products as a function of particle size. **Journal of Cereal Science**, v.75, p.269-277, 2017.

CAPPELLI, A. *et al.* Improving whole wheat dough tenacity and extensibility: A new kneading process. **Journal of Cereal Science**, v.90, p.102852, 2019.

CHI, C.H.; CHO, S.J. Improvement of bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus amyloliquefaciens* versus *Lactobacillus* spp. and *Saccharomyces cerevisiae*. **LWT - Food Science and Technology**, v.68, p.619-625, 2016.

CHLOPICKA, J. *et al.* Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudocereal breads. **Food Science and Technology**, v.46, p.548-555, 2012.

de ARAÚJO, M.E.M.B. *et al.* Enzymatic de-glycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities. **Food Chemistry**, v.141, p.266-273, 2013.

DINELLI, G. *et al.* Profiles of phenolic compounds in modern and old common wheat varieties determined by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p.7670–7681, 2011.

DYNKOWSKA, W.M.; CYRAN, M.R.; CEGLIŃSKA, A. Soluble and cell wall-bound phenolic acids and ferulic acid dehydrodimers in rye flour and five bread model systems: insight into mechanisms of improved availability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.95, p.1103-1115, 2015.

FAKHFAKH, N. *et al.* The mallow, *Malva aegyptiaca* L. (Malvaceae): Phytochemistry analysis and effects on wheat dough performance and bread quality. **LWT – Food Science and Technology**, v.75, p.656-662, 2017.

FARBO, M.G. *et al.* Improving the quality of dough obtained with old durum wheat using hydrocolloids. **Food Hydrocolloids**, v.101, p.105467, 2020.

FERRARIO, M. *et al.* Development and quality assessment of a turbid carrot-orange juice blend processed by UV-C light assisted by mild heat and addition of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) extract. **Food Chemistry**, v.269, p.567-576, 2018.

GÓMEZ, M.; MARTINEZ, M.M. Fruit and vegetable by-products as novel ingredients to improve the nutritional quality of baked goods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.58, p.2119-2135, 2018.

HAN, H.M.; KOH, B.K. Antioxidant activity of hard wheat flour, dough and bread prepared using various processes with the addition of different phenolic acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, p.604-608, 2011.

HUR, S.J. *et al.* Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. **Food Chemistry**, v.160, p.346-356, 2014.

LIN, J. *et al.* *In vitro* bioaccessibility and bioavailability of quercetin from the quercetin-fortified bread products with reduced glycemic potential. **Food Chemistry**, v.286, p.629-635, 2019.

LIU, X. *et al.* Influence of potato flour on dough rheological properties and quality of steamed bread. **Journal of Integrative Agriculture**, v.15, p.2666-2676, 2016.

LUKŠIČ, L. *et al.* Rutin and quercetin transformation during preparation of buck wheat sourdough bread. **Journal of Cereal Science**, v.69, p.71-76, 2016.

MARTI, A. *et al.* From wheat sourdough to gluten-free sourdough: a non-conventional process for producing gluten-free bread. **International Journal of Food Science and Technology**, v.50, p.1268–1274, 2015.

MATEO ANSON, N. *et al.* Bioprocessing of wheat bran in whole wheat bread increases the bioavailability of phenolic acids in men and exerts anti-inflammatory effects *ex vivo*. **The Journal of Nutrition**, v.141(1), p.137-143, 2011.

- MOORE, J. *et al.* Effects of baking conditions, dough fermentation, and bran particle size on antioxidant properties of whole-wheat pizza crusts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.832-839, 2009.
- NING, J. *et al.* Effect of green tea powder on the quality attributes and antioxidant activity of whole-wheat flour pan bread. **LWT – Food Science and Technology**, v.79, p.342-348, 2017.
- OTHMAN, N.B. *et al.* Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. **Food Chemistry**, v.116, p.662-669, 2009.
- OU, J. *et al.* Positive and negative effects of polyphenol incorporation in baked foods. **Food Chemistry**, v.284, p.90-99, 2019.
- OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v.51, p.954-970, 2013.
- RANI, P. *et al.* Impact of fermentation and extrusion processing on physicochemical, sensory and bioactive properties of rice-black gram mixed flour. **LWT - Food Science and Technology**, v.89, p.155-163, 2018.
- RANJBAR, A. *et al.* Effect of iron-enrichment on the antioxidant properties of wheat flour and bread. **Journal of Cereal Science**, v.87, p.98-102, 2019.
- RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying in improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p.1231-1237, 1999.
- RUBIO, F.T.V. *et al.* Enrichment of waste yeast with bioactive compounds from grape pomace as an innovative and emerging technology: Kinetics, isotherms and bioaccessibility. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.45, p.18-28, 2019.
- SANTINI, A.; NOVELLINO, E. Nutraceuticals - shedding light on the grey area between pharmaceuticals and food. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v.11, p.545-547, 2018.
- SERAGLIO, S.K.T. *et al.* Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach. **Food Research International**, v.87, p.60–67, 2016.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.
- TIAN, W. *et al.* Changes in phenolic profiles and antioxidant activities during the whole wheat flour bread-making process. **Food Chemistry**, v.345, p.128851, 2021.
- VERARDO, V. *et al.* Determination of free and bound phenolic compounds and their antioxidant activity in buckwheat bread loaf, crust and crumb. **LWT - Food Science and Technology**, v.87, p.217-224, 2018.

XU, X. *et al.* Effects of superfine grinding of bran on the properties of dough and qualities of steamed bread. **Journal of Cereal Science**, v.81, p.76-82, 2018.

XU, J.; WANG, W.; LI, Y. Dough properties, bread quality, and associated interactions with added phenolic compounds: A review. **Journal of Functional Foods**, v.52, p.629-639, 2019.

WU, T. *et al.* Effect of milling methods on the properties of rice flour and gluten-free rice bread. **LWT – Food Science and Technology**, v.18, p.137-144, 2019.

YU, L.; BETA, T. Identification and antioxidant Properties of Phenolic Compounds during Production of Bread from Purple Wheat Grains. **Molecules**, v.20, p.15525–15549, 2015.

CAPÍTULO 4

ANÁLISE DO PERFIL FENÓLICO EM PÃES DE TRIGO INTEGRAL COM ERVA-MATE E OS EFEITOS DO PROCESSO DE PANIFICAÇÃO ATRAVÉS DA METABOLÔMICA NÃO-DIRECIONADA

Nota: O texto e dados discutidos neste capítulo foram reproduzidos ou adaptados da publicação de autoria de Gabriela Soster Santetti, Luciana Ribeiro da Silva Lima, Barbara Biduski, Millena Cristina Barros Santos, Carolina Thomaz dos Santos D’Almeida, Luiz Claudio Cameron, Luiz Carlos Gutkoski, Mariana Simões Larraz Ferreira, Renata Dias de Mello Castanho Amboni, disponível em *Food Research International*, v.159, p. 111635, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111635> (ANEXO C).

RESUMO

A análise metabolômica não direcionada foi aplicada para avaliar o perfil fenólico de pães integrais com erva-mate (EM) durante o processo de panificação (farinha, massa e pão). O conteúdo de fenólicos livres, ligados e totais das amostras, avaliados pelo método de Folin-Ciocalteu, apresentaram os maiores valores para as farinhas, massas e pães elaborados com 4,5% EM nos tamanhos de partículas fina e média (farinha 18,48 – 175,26 mg AGE/ g; massa 149,62 – 141,40 mg AGE/g; e pão 148,32 – 147,00 mg AGE/ g). Um total de 104 compostos fenólicos foram identificados provisoriamente, pertencentes às cinco subclasses: flavonoides (35), ácidos fenólicos (32), outros polifenóis (10), estilbenos (2) e lignana (1). Destes compostos, 24 tinham o mesmo *m/z*, porém, apresentavam diferentes perfis de fragmentação. O maior número de compostos fenólicos identificados foi observado nos extratos ligados (77%) quando comparado aos extratos livres (59%). A adição de 4,5% de EM promoveu um perfil mais abundante de compostos fenólicos nas massas e nos pães. Os principais compostos encontrados nas amostras contendo erva-mate foram o ácido 5-cafeoilquínico e o ácido cafeico. Ainda, o cozimento dos pães não afetou negativamente a abundância dos compostos fenólicos. Diante do exposto, o processo de panificação apresentou efeitos positivos sobre o perfil de compostos fenólicos no produto final ocasionado pela liberação de compostos fenólicos ligados; ao mesmo tempo que a adição de erva-mate como ingrediente natural promoveu o aumento dos polifenóis no pão.

Palavras-chave: Espectrometria de massas, compostos bioativos, polifenóis, produtos de panificação, processo de panificação, análises multivariadas.

ABSTRACT

Untargeted metabolomics analysis was applied to evaluate the phenolic profile of whole wheat bread with yerba mate (YM) during the bread-making process (flour, dough and bread). The free, bound and total phenolic contents of the samples evaluated by the Folin-Ciocalteu method showed the highest values for the flour, dough and bread samples prepared with 4.5% YM in fine and medium particle sizes (flour 181.48 – 175.26 mg GAE/g; dough 149.62 – 141.40 mg GAE/g; and bread 148.32 – 147.00 mg GAE/g). Globally, 104 phenolic compounds were tentatively identified, belonging to the five subclasses: flavonoids (35), phenolic acids (32), other polyphenols (10), stilbenes (2) and lignan (1). Of these compounds, 24 had the same *m/z* but showed different fragmentation profiles. A higher number of polyphenols was identified in the bound extracts (77%) than in the free extracts (59%). The addition of 4.5% of YM promoted an improved and more abundant profile of phenolic compounds in the dough and bread. The major compounds found in the samples containing YM were 5-caffeoylquinic acid and caffeic acid. The baking process did not adversely affect the abundance of phenolic compounds. The bread-making process positively affected the phenolic profile due to the release of bound phenolic compounds. At the same time, the addition of YM as a natural ingredient promoted an increase in the polyphenols in the bread.

Keywords: Mass spectrometry, bioactive compounds, polyphenols, bakery products, bread-making process, multivariate analysis

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a adição de ingredientes naturais em produtos alimentícios tem se tornado frequente, uma vez que os consumidores estão cada vez mais conscientes e atentos sobre os benefícios destes produtos. Geralmente, os ingredientes naturais são escolhidos de acordo com a sua composição fitoquímica.

A *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., planta nativa da região subtropical da América do Sul, tem sido amplamente consumida em diversos países, principalmente na forma de bebida, como chá quente ou frio, conhecida como erva-mate (EM). A planta também é adicionada em diferentes produtos alimentícios, atuando como antioxidante natural (MATEOS *et al.*, 2018; CHEMINET *et al.*, 2021), uma vez que as folhas apresentam propriedades farmacológicas conhecidas, como ação antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (BRACESCO *et al.*, 2011; GAN *et al.*, 2018). Essas propriedades estão associadas ao seu elevado conteúdo de compostos fenólicos (SANTETTI *et al.*, 2021a). Alguns compostos fenólicos da erva-mate, como ácido 5-cafeoilquínico, rutina, isoquercetina e ácido cafeico podem aumentar a funcionalidade de produtos alimentícios devido as suas atividades biológicas (MATEOS *et al.*, 2018)

Diversos estudos visam a incorporação de compostos fenólicos de diferentes fontes vegetais em produtos de panificação, buscando intensificar os seus efeitos benéficos quando consumidos. Essa incorporação, geralmente é realizada em pães, bolos e biscoitos, uma vez que possibilitam melhorar as suas propriedades nutricionais e funcionais (MARTINS *et al.*, 2017; OU *et al.*, 2019). Com isso, a incorporação de folhas de erva-mate (EM) é uma alternativa promissora para a indústria de panificação.

Dentre os produtos panificáveis, o pão é geralmente utilizado como principal veículo para incorporação de ingredientes bioativos, devido ao seu alto nível de consumo, aceitação sensorial e diversidade, sendo um dos alimentos mais consumidos no mundo (GENG *et al.*, 2016; VALLI *et al.*, 2018). Contudo, na produção de pães, as etapas de fermentação e cocção podem determinar as características funcionais e de qualidade do produto final. O processo de cozimento pode levar a um aumento ou diminuição do conteúdo fenólico do pão quando comparado à farinha e à massa. Isso pode ocorrer pela ação de fenômenos químicos como degradação térmica, polimerização/despolimerização, liberação de fenólicos ligados e a formação de produtos da reação de *Maillard*, que podem ocorrer durante o processo (DRAKULA *et al.*, 2021).

Por essa razão, os potenciais efeitos dos compostos bioativos na saúde dependem exclusivamente de sua estabilidade ou transformação durante o processo (GERM *et al.*, 2019). Tem sido relatado que alguns compostos fenólicos não são termicamente estáveis, indicando que altas temperatura durante o cozimento do pão podem causar a clivagem da porção glicosil da aglicona, levando a alteração na sua disponibilidade do composto original (OU *et al.*, 2019). No entanto, em nosso estudo anterior, verificamos que o processo fermentativo da massa melhora as propriedades antioxidantes através do aumento do conteúdo de ácidos fenólicos livres (SANTETTI *et al.*, 2021a). Ainda, a adição de erva-mate pode melhorar o perfil de compostos fenólicos e permitir a obtenção de um produto de panificação com elevada bioatividade. Assim, o perfil fenólico durante o processo de panificação deve ser investigado, pois alterações físicas e químicas podem ocorrer, levando a mudanças estruturais no composto original com redução ou até mesmo transformação em outros compostos. Além disso, este estudo pode enfatizar a importância da incorporação de um produto regional rico em polifenóis de diferentes classes, como flavonoides e ácidos fenólicos (MATEOS *et al.*, 2018), em produtos de panificação. Contudo, não há investigações relatadas sobre as mudanças no perfil fenólico em pães elaborados com erva-mate durante o processo de panificação.

Diante do exposto, hipotetizamos que o processo de panificação pode aumentar o conteúdo de compostos fenólicos, levando potenciais benefícios no consumo pelos consumidores de pão de trigo integral elaborado com erva-mate. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o perfil de compostos fenólicos, ao longo do processo de panificação, de amostras de farinha, massa de pão com adição de EM. As ferramentas metabolômicas baseadas em uma abordagem não direcionada foram utilizadas para identificar relativamente os compostos fenólicos em folhas de erva-mate em dois tamanhos de partículas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais e químicos

Os grãos de trigo (*Triticum aestivum* L.), do cultivar Toruk, safra 2017/2018, foram cedidos pela empresa Biotrigo Genética-Ltda (Passo Fundo, Brasil). As folhas de erva-mate da safra de 2017, foram cedidas pela empresa Inovamate (Ilópolis, Brasil). Os ingredientes utilizados para a produção dos pães foram adquiridos em comércio local.

Os solventes de grau LC-MS (acetonitrila, etanol e metanol) e os padrões dos compostos fenólicos (ácido benzoico, ácido cafeico, catequina, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido epicatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina, flavonona, ácido gálico, campeferol, ácido L-(-)-3-fenilacético, miricetina, ácido *p*-cumárico, pirogalol, quercetina, quercetina 3-glicosídeo, ácido sinápinico, ácido trans-cinâmico, ácido isoferulico, ácido vanílico, álcool 4-hidroxibenzílico, 4-hidroxibenzaldeído, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido 4-fenilacético, ácido 3,4-dihidroxifenilacético, ácido 2,5-dihidroxibenzóico, ácido 4-metoxicinâmico, ácido 2-hidroxicinâmico, 3-ácido hidroxí-4-metoxicinâmico, ácido 3-metoxicinâmico) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Celite® 545 e ácido fórmico, aditivo eluente para LC-MS, foram obtidos da Fluka (Suíça) e os demais reagentes (acetato de etila, ácido clorídrico e hidróxido de sódio) foram de grau analítico. Um sistema Barnstad™Smart2Pure™ (Thermo Fisher Scientific, EUA) foi utilizado para purificar a água empregada nos experimentos.

2.2 Farinha de trigo integral, folhas de erva-mate e preparação dos pães

A farinha de trigo integral (FTI) e as folhas de erva-mate (EM) foram preparadas de acordo com nosso estudo anterior (SANTETTI *et al.*, 2021b). Resumidamente, os grãos de trigo foram moídos em moinho experimental (CD1, Chopin, França) para obtenção de frações da farinha refinada, farelo e germe. O farelo e o germe foram moídos novamente até passar numa peneira de 30 mesh. Por fim, as frações foram reincorporadas na farinha refinada para obter a farinha de trigo integral (FTI). As folhas de erva-mate foram branqueadas (95 °C por 30 s) e secas em estufa de circulação de ar forçado (45 °C por 4 h). As folhas foram moídas em moinho de facas (Marconi, M048, Brasil) até os tamanhos de partículas de 245 e 415,5 µm (APÊNDICE C, Figura 1), nomeadas como erva-mate fina (EMF) e erva-mate média (EMM), respectivamente.

O delineamento experimental foi definido onde as folhas de EM foram adicionadas na FTI (g EM/100 g FTI; m/m) em duas proporções para cada tamanho de partícula (fino e médio). Foram preparados cinco tratamentos nomeados: EM Fina (2,5 e 4,5%; m/m), EM Média (2,5 e 4,5%; m/m) e amostra controle FTI (sem EM). As amostras de farinha (F), massa (M) e pão (P) foram nomeadas da seguinte forma: F (controle), F1 (2,5% EMF), F2 (4,5% EMF), F3 (2,5% EMM) e F4 (4,5% EMM), para as farinhas; M (controle), M1 (2,5%, EMF), M2 (4,5% EMF), M3 (2,5% EMM) e M4 (4,5% EMM), para as massas; e, por fim, P (controle), P1 (2,5% EMF), P2 (4,5% EMF), P3 (2,5% EMM) e P4 (4,5% EMM), para os pães. A quantidade de EM incorporada na FTI foi determinada em testes preliminares, e a composição química da EMF, EMM e FTI foi recentemente reportado por Santetti *et al.* (2021b).

Os pães foram elaborados de acordo com o método descrito por Bressiani *et al.* (2017), utilizando um teste laboratorial em pequena escala. As formulações dos pães foram compostas por farinha, gordura hidrogenada, cloreto de sódio, ácido ascórbico, açúcar, fermento e água. Porções de 35 g de massa foram divididas e encaminhadas para a fermentação em câmara fermentativa (Multipão, Brasil) a 30 °C durante 60 min. O cozimento dos pães foi realizado em forno de laboratório a 150 °C por 12 min (SANTETTI *et al.*, 2021b).

2.3 Extração dos compostos fenólicos livres e ligados

As amostras de massa e pão foram liofilizadas durante 48 h, moídas e peneiradas utilizando uma peneira de 30 mesh (NING *et al.*, 2017). Os compostos fenólicos livres das amostras de farinha, massa e pão foram extraídos com etanol 80%, enquanto que os compostos fenólicos ligados foram obtidos a partir dos pellets e após hidrólise alcalina e ácida, conforme descrito por Santos *et al.* (2019). Os extratos secos obtidos foram ressuspensos em 1,5 mL de metanol (2%), acetonitrila (5%) e água MiliQ (93%), filtrados através de filtros hidrofílicos analíticos (13 mm de diâmetro; 0,22 µm) (Analítica, Brasil), transferido para vials (Waters, USA) e armazenados a -20 °C até análise de UPLC-MS^E.

2.4 Conteúdo fenólico

O conteúdo de fenólicos livre, ligado e total foi avaliado nas farinhas, massas e pães. O conteúdo total foi determinado pela soma dos valores dos extratos livres e ligados

obtidos de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON *et al.* 1999). A quantificação foi baseada em uma curva padrão de ácido gálico ($y = 0,0161x + 0.0133$; $R^2 = 0,9953$) e os resultados expressos em mg ácido gálico por 100 g de amostra em base seca (mg AGE/100 g).

2.5 Determinação do perfil fenólico por UPLC-MS^E

O perfil fenólico foi determinado baseado em um método descrito por Santos *et al.* (2019), com algumas modificações. Resumidamente, 5 μ L de cada amostra e uma mistura contendo 33 padrões analíticos de compostos fenólicos (10 mg/L) foram injetados no UPLC Acquity system (Waters Co., Milford, MA) acoplado a um XEVO G2S Q-Tof (Waters Co., Manchester, UK) equipado com uma fonte de ionização ESI operando em modo negativo. O método do gradiente cromatográfico foi realizado da seguinte forma: 0 min – 97% A; 11,80 min - 50% A; 12,38 min - 15% A; 14,23 min - 15% A; 14,70 min - 97% A (fase A água MilliQ com 0,3% de ácido fórmico e formato de amônio de 5 mmol/L e a fase B acetonitrila com 0,3% de ácido fórmico). O gás de dessolvatação (N₂) foi fixado em 1000 L/h e 500 °C, enquanto o gás em cone foi fixado em 50 L/h e a fonte em 150 °C. A faixa de varredura em massa na aquisição MS/MS foi de m/z 50 a 1200 Da e a rampa de energia de colisão foi de 20 a 45 eV para a fragmentação, utilizando argônio ultrapuro (Ar) como gás de colisão. Além disso, as amostras de controle de qualidade agrupadas (QC) foram injetadas após cada conjunto de 9 injeções das amostras analisadas para monitorar o desempenho do instrumento e a qualidade dos dados.

2.6 Processamento dos dados

Os dados brutos obtidos por UPLC-MS^E foram processados e submetidos a uma etapa de normalização no software Progenesis QI, v. 2.1 (NonLinear Dynamics, Waters Co.) respeitando as seguintes condições: dados centroides, resolução de largura total na metade máxima de 30.000 e ionização em modo negativo. A identificação dos compostos foi então realizada por comparação dos dados obtidos com os padrões analíticos e um banco de dados customizados para polifenóis obtido do PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e um banco de dados online Phenol-Explorer v 3.6, com base no erro de massa exato (< 10 ppm), distribuição isotópica de massa neutra (> 80%) e tempo de retenção, conforme recomendações de Sumner *et al.* (2007). O perfil

dos fragmentos MS/MS também foi considerado na identificação por meio do uso de bancos de dados específicos, como MassBank of North America (MoNA) (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>) e NORMAN MassBank (<https://massbank.eu/MassBank/>).

2.7 Análise estatística

Os dados gerados pelo programa Progenesis QI foram exportados para EZinfo 3.0 (Waters) para realizar a análise multivariada de componentes principais (PCA) e análise discriminante dos mínimos quadrados (PLS-DA). Análise hierárquica de cluster (HCA) e a análise de mapa de calor foram realizados utilizando o servidor web Metaboanalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>). Os resultados foram submetidos a análise de variância unidirecional (ANOVA) com intervalo de confiança de 95% e as médias foram comparadas aplicando o teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o XLSTAT software (Addinsoft, França). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Conteúdo de fenólicos da farinha, massa e pão

A Tabela 1 apresenta o conteúdo fenólico livre, ligado e total das farinhas, massas e dos pães. O maior conteúdo de fenólicos livres ($p < 0,05$) foi observado nas amostras de massa e pão com a maior proporção de erva-mate (4,5%) e tamanho de partícula fino (F2, M2 e P2). Como esperado, uma maior proporção de erva-mate promove um maior conteúdo fenólicos, enquanto que o tamanho de partícula possibilitou maior exposição e liberação dos compostos (SANTETTI *et al.*, 2021a; BUTIUK *et al.*, 2021). Além disso, os compostos fenólicos livres nas amostras de farinha com adição de erva-mate foram maiores ($p < 0,05$) do que o conteúdo encontrado na massa e no pão. Isso pode ser explicado pelo fato de que a erva-mate está mais disponível e exposta na matriz, fazendo com que o solvente utilizado extraia maior quantidade de fenólicos livres (ALVES; PERRONE, 2015). Por outro lado, é importante salientar que o método de Folin-Ciocalteu pode superestimar o valor, já que alguns compostos detectados pelo reagente podem não ser classificados como compostos fenólicos. Para as amostras de massa e pão M4 e P4, respectivamente, compreendendo 4,5% EMM, apresentaram maior conteúdo de

fenólicos livres. No entanto, as amostras de farinha, massa e pão controle apresentaram menor ($p < 0,05$) teor de fenólicos nas duas formas (livres e ligados).

Tabela 1. Compostos fenólicos livres, ligados e totais das amostras de farinha, massa e pão elaboradas com a adição de erva-mate

Amostras	Livres (mg AGE/g)	Ligados (mg AGE/g)	Totais (mg AGE/g)
Farinha			
F	54,55 ± 0,83 ^{Ge}	63,05 ± 0,82 ^{ABb}	116,81 ± 0,94 ^{Fe}
F1	80,79 ± 0,82 ^{Ed}	57,18 ± 0,50 ^{Cc}	137,97 ± 1,02 ^{Ed}
F2	122,68 ± 0,16 ^{Aa}	65,07 ± 0,15 ^{Aa}	181,48 ± 0,08 ^{Aa}
F3	98,26 ± 0,19 ^{CDc}	58,80 ± 1,00 ^{BCc}	163,32 ± 1,18 ^{Cc}
F4	113,04 ± 0,53 ^{Bb}	62,22 ± 1,41 ^{ABc}	175,26 ± 1,93 ^{Bb}
Massa			
M	29,85 ± 0,33 ^{Hd}	38,52 ± 0,56 ^{Fc}	68,37 ± 0,70 ^{Id}
M1	69,18 ± 2,53 ^{Fc}	44,38 ± 2,24 ^{Eb}	113,56 ± 3,46 ^{Fc}
M2	98,75 ± 0,25 ^{CDa}	50,88 ± 0,56 ^{Da}	149,62 ± 0,69 ^{Da}
M3	68,57 ± 0,19 ^{Fc}	44,06 ± 0,73 ^{Eb}	112,63 ± 0,56 ^{FGc}
M4	95,24 ± 1,00 ^{Db}	46,16 ± 0,83 ^{Eb}	141,4 ± 1,09 ^{Eb}
Pão			
P	29,03 ± 2,99 ^{Hc}	37,4 ± 0,83 ^{Fc}	66,43 ± 3,68 ^{Ic}
P1	68,79 ± 4,60 ^{Fb}	34,81 ± 3,67 ^{Fc}	103,60 ± 8,22 ^{Hb}
P2	101,21 ± 2,15 ^{Ca}	47,11 ± 1,04 ^{DEab}	148,32 ± 2,88 ^{Da}
P3	64,25 ± 2,63 ^{Fb}	43,97 ± 2,68 ^{Eb}	108,22 ± 3,40 ^{GHb}
P4	95,74 ± 0,16 ^{CDa}	51,27 ± 0,88 ^{Da}	147,00 ± 0,91 ^{Da}

Cada valor é apresentado como média ± desvio padrão (n=3). Letras maiúsculas na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre massa e pão. Letras minúsculas na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre massa e pão, separadamente. As médias foram submetidas ao teste de Tukey, para cada parâmetro. M: massa de farinha de trigo integral. P: pão de farinha de trigo integral. M1 e M2: massa elaborada com 2,5 e 4,5% de EM fina (m/m). M3 e M4: massa elaborada com 2,5 e 4,5% de EM média (m/m). P1 e P2: pão elaborado com 2,5 e 4,5% de EM fina (m/m). P3 e P4: pão elaborado com 2,5 e 4,5% de EM média (m/m).

Em relação aos resultados obtidos para as amostras M1 e P1, a proporção de 2,5% pode não ter sido suficiente para promover possíveis alterações durante o processamento, devido ao fator diluição resultante da baixa concentração de erva-mate na FTI, em comparação com a concentração de 4,5%. Foi observada redução ($p < 0,05$) do teor de

fenólicos livres entre as amostras de massa e pão (M3 e P3) com 2,5% EMM, evidenciando que os compostos fenólicos foram afetados pela ação da temperatura do forno. Por outro lado, as amostras de massa M2 e o pão P4 (4,5% EM fina e média, respectivamente), apresentaram um maior conteúdo de fenólicos ligados quando comparado as outras amostras ($p < 0,05$). Contudo, a amostra M4 e P4 não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Para a amostra de pão (P4), a explicação pode estar relacionada pelas altas temperaturas de forneamento, que favorecem a hidrólise de polissacarídeos, e, assim, tornando compostos fenólicos ligados mais disponíveis (CÁLINOIU; VODNAR, 2020). Shahidi & Yeo (2016) reportaram que o processo de cozimento dos alimentos afeta o conteúdo fenólico, principalmente os compostos fenólicos ligados, uma vez que, a temperatura é capaz de liberar estes compostos para a matriz. Além disso, o processo fermentativo também leva ao aumento nos compostos fenólicos livres (SANTETTI *et al.*, 2021b). Ainda, a presença da maior proporção da EM facilitou a maior extração e quantificação dos compostos fenólicos livres.

De forma geral, o conteúdo de fenólicos livres foi superior ao de fenólicos ligados, representando 62% do total dos compostos fenólicos nas amostras de massa e pão, exceto para as amostras controle. Enquanto isso, na amostra controle, o conteúdo fenólico ligado representou 53% do total (Tabela 1), e isso é comprovado pelo fato da maior quantidade de compostos fenólicos encontrados em grãos de trigo estarem na forma ligada (SANTOS *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos geralmente ocorrem nas plantas em sua forma solúvel (livre ou conjugada a carboidratos solúveis por ligações éster/éter), e, assim, estão mais susceptíveis a quantificação, enquanto, que a outra parte dos compostos se encontram na forma insolúvel (ligada por ligações éster/éter aos constituintes da parede celular), necessitando de ações químicas e/ou físicas para a sua liberação (ARIGÒA *et al.*, 2018). Apesar de que nos cereais a fração ligada seja preponderante (ACOSTA-ESTRADA *et al.*, 2014), neste estudo, após a adição de erva-mate, foi observado um maior teor de compostos fenólicos totais na fração livre, demonstrando uma importante contribuição da EM para o conteúdo fenólico.

É possível que o alto teor de fenólicos livres é seja devido ao efeito do processo de fermentação e da temperatura de cozimento, que pode levar a hidrólise de alguns fenóis complexos resultando no seu aumento; além disso, a reação de *Maillard* no processo de panificação pode, em certa medida, influenciar no conteúdo fenólico (VERARDO *et al.*,

2018; OU *et al.*, 2019; ANTOGNONI *et al.*, 2019). Após a liberação térmica de alguns ácidos fenólicos durante o cozimento, compostos como ácido ferúlico podem ser incorporados à estrutura das melanoidinas, que são conhecidas por serem produtos finais da reação de *Maillard* (ÇELIK; GÖKMEN, 2020). De acordo com Žilić *et al.* (2013), esses compostos podem estar presentes tanto na sua forma livre, como na forma ligada. Contudo, os fenólicos ligados se apresentam em maior quantidade, devido a possíveis ligações glicosídicas que ocorrem entre os ácidos fenólicos e melanoidinas. Assim, estes compostos podem ser identificados na matriz e apresentar atividade antioxidante no pão (NOOSHKAM *et al.*, 2019).

Estes resultados sustentam a hipótese de que a temperatura de cocção pode interferir de duas formas o conteúdo fenólico do pão: i) podendo levar a sua oxidação ou ii) liberando novos compostos fenólicos para a matriz. Como os compostos fenólicos são altamente reativos, o cozimento pode alterar sua natureza física e química através, por exemplo, da degradação, polimerização, oxidação e liberação de formas ligadas de fenóis (PALERMO *et al.*, 2014). Além disso, a erva-mate adicionada promove o aumento no conteúdo fenólico em ambas as formas (livres e ligados), favorecendo o desenvolvimento de um pão integral com apelo funcional. Os benefícios associados à saúde com estes fitoquímicos são decorrentes de suas propriedades biológicas, como atividade antioxidante e anti-inflamatória. Diante do exposto, ferramentas robustas como a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas podem auxiliar na elucidação dos compostos bioativos presentes na massa e no pão, uma vez que podem ser alterados, degradados ou até mesmo liberados devido o processamento do pão e pela temperatura do forno.

3.2 Perfil fenólico durante o processamento do pão determinado por UPLC-MS^E

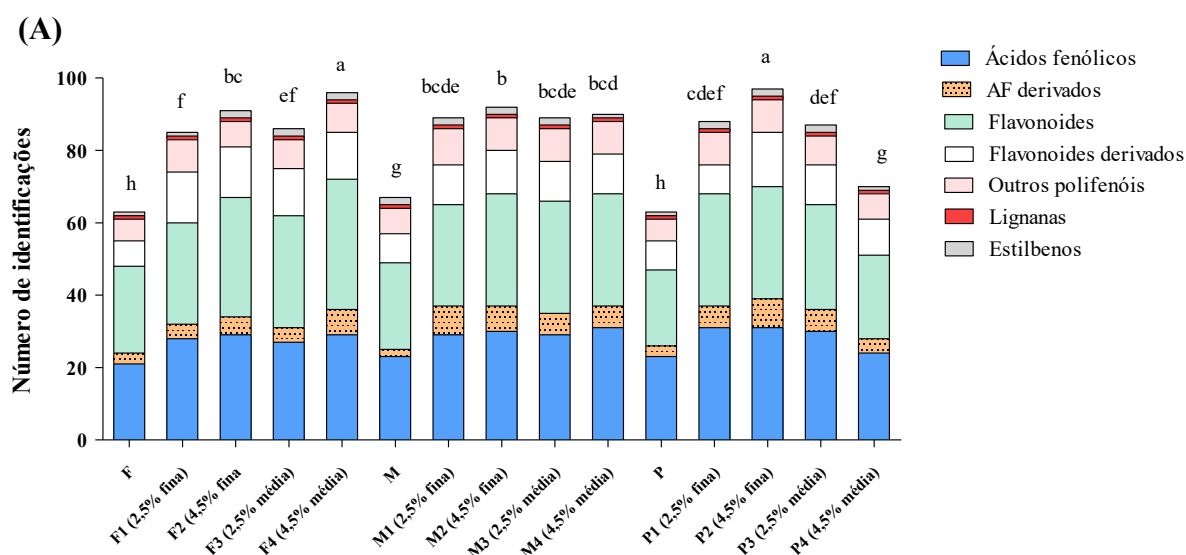
A fim de obter uma caracterização abrangente do perfil de compostos fenólicos das amostras elaboradas pela incorporação de EM na farinha de trigo integral (em diferentes proporções e tamanhos de partículas), bem como o efeito do cozimento do pão neste perfil, as amostras foram submetidas a uma análise metabolômica não direcionada, utilizando um sistema de UPLC-MS^E.

Um total de 104 compostos fenólicos foram putativamente identificados, incluindo alguns isômeros, englobando diferentes classes. Estes compostos e os parâmetros utilizados para a identificação são descritos na Tabela 1 e Tabela 2

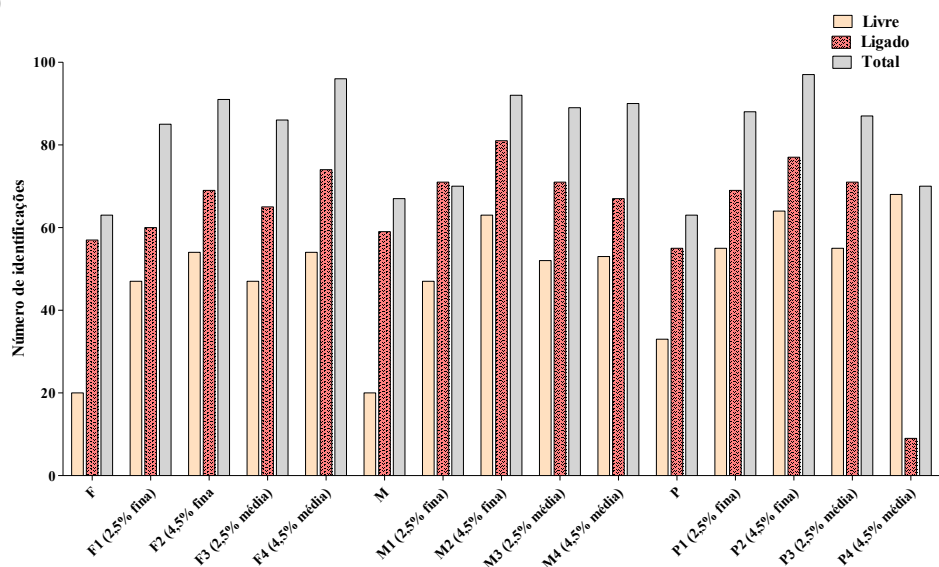
(APÊNDICE C). Dentre estes compostos, 24 apresentaram m/z igual, porém, com perfis de fragmentação diferentes. Ainda que não tenha sido possível confirmar sua identidade com base nos íons fragmentados gerados pela análise UPLC-MS^E e nos demais dados considerados na identificação, foi possível classificar esses compostos desconhecidos em derivados de flavonoides e ácidos fenólicos. Treze compostos fenólicos foram confirmados a partir de padrões analíticos, incluindo quercetina, ácido ferúlico, ácido 5-cafeoilquínico e vanilina (compostos em negrito na Tabela 1 e 2 do APÊNDICE C).

A Figura 1A apresenta o número de identificações de compostos fenólicos para cada classe e para todas as amostras (farinha, massa e pão). Globalmente, foram identificadas cinco subclasses para todas as amostras, sendo a classe dos flavonoides com o maior número de compostos identificados (35), seguido pelos ácidos fenólicos (32), outros polifenóis (10), estilbenos (2) e lignanas (1). Para todas as amostras, os extratos ligados apresentaram o maior número de compostos fenólicos identificados, representando 77% do total quando comparado aos extratos livres (Figura 1B).

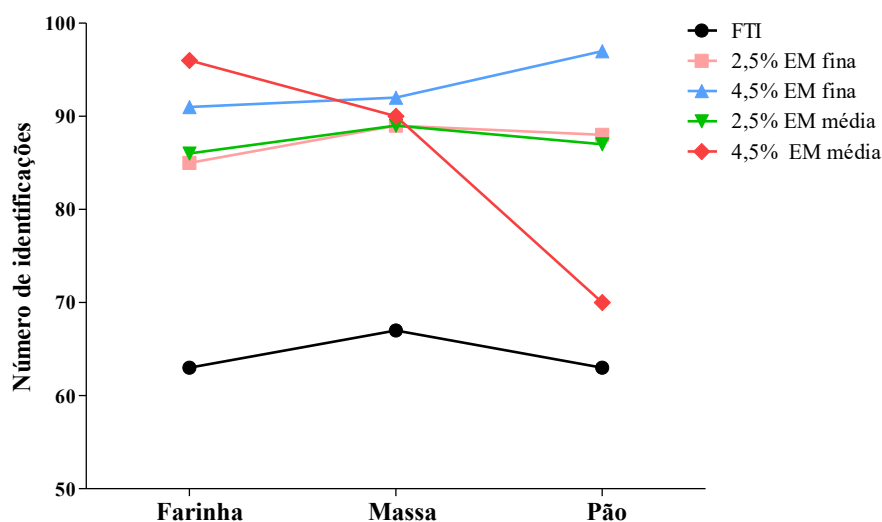
Figura 1. Número de compostos fenólicos identificados para cada classe e amostra (A), extrato (B) e (C) a evolução durante as etapas de panificação.



(B)



(C)



A subclasse dos flavonoides e seus derivados representa 49% do total de identificações, seguido dos ácidos fenólicos e derivados (38%), outros polifenóis (10%), estilbenos (2%) e lignanas (1%). Flavonoides e ácidos fenólicos são comumente encontrados na erva-mate, como também na farinha de trigo integral (MATEOS *et al.*, 2018; TIAN *et al.*, 2021), corroborando com estes resultados e confirmando a sua predominância.

Além disso, os flavonoides são mais estáveis durante o processo de cozimento do pão, já que as suas estruturas são ligadas por ligações glicosídicas formadas através de ligantes de açúcar (como glicose, ramnose e galactose) (OU *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2020). Neste estudo, a quercetina apresentou um aumento notável nas amostras de pão

(composto número 32 na Tabela 1 e 2 do APÊNDICE C). Esse aumento pode ser explicado pela transformação da rutina em quercetina durante o cozimento do pão, onde a temperatura e a adição de água e fermento podem alterar o meio, e, conseqüentemente, fazer com que o composto seja liberado (BRITES *et al.*, 2022).

Isso explica a sua maior abundância quando comparado com os ácidos fenólicos, os quais são mais susceptíveis a interações com as proteínas do glúten, formando complexos covalentes com os grupos sulfidrilas (S-H), resultando em uma menor quantificação dos compostos livres na matriz (XU *et al.*, 2019).

Avaliando ainda o número de identificações, de maneira geral, as amostras incorporadas de erva-mate apresentaram maior número de compostos fenólicos em comparação com as amostras controle em todas as etapas do processo (farinha, massa e pão). Dentre as farinhas, a F4 (4,5% EM média; m/m), apresentou o maior número de identificações, enquanto nos pães, a amostra P2 (4,5% EM fina; m/m) apresentou o maior número de identificações (Figura 1A). Contudo, as amostras de massa M1-M4 não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$) para o número total de compostos identificados, exceto em relação a massa controle, que apresentou o menor número. A massa M2 e o pão P2, elaborados com a maior proporção de erva-mate (4,5%) e no menor tamanho de partícula (EMF), apresentaram maior número de identificação de compostos, e isso pode ser justificado pela maior quantidade de EM adicionada, além da maior superfície de contato da EMF, que podem ter favorecido as interações químicas durante o processamento do pão (SANTETTI *et al.*, 2021a; BUTIUK *et al.*, 2021). Além disso, estes resultados corroboram com os dados encontrados para análise de compostos fenólicos totais (Tabela 1), estimados a partir do método de capacidade de redução de Folin-Ciocalteu.

O aumento dos compostos fenólicos com a adição de erva-mate era esperado, devido aos seus altos teores de componentes bioativos, principalmente polifenóis. Embora não tenha sido analisada, a contribuição fenólica da erva-mate isolada pode ser atribuída principalmente à classe dos ácidos fenólicos, com valor quatro vezes superior ao encontrado na FTI (Figura 1B). Isso corrobora com os resultados relatados por Mateos *et al.* (2018), que descobriram que a classe dos ácidos fenólicos compreende 90% dos fenóis da *Ilex paraguariensis*. Dentre estes compostos, o ácido 3-cafeoilquínico e seus isômeros são os principais compostos presentes na erva-mate (MATEOS *et al.*, 2018), em concordância com os resultados do presente estudo, uma vez que esses compostos só foram identificados após a adição da erva-mate (compostos número 55,60 e 62 na Tabela

1 e 2 do APÊNDICE C). Por fim, esses ácidos fenólicos da erva-mate estão presentes principalmente em extratos livres (Figura 1A), o que pode afetar positivamente sua biodisponibilidade durante a digestão humana.

Considerando a abundância total relativa de íons, 20 compostos se destacaram como mais abundantes em todos os extratos nas amostras de farinha, massa e pão (Tabela 2). Ao observar a evolução da abundância dos compostos identificados durante as etapas de fabricação dos pães elaborados, as amostras P1, P2 e P3 apresentaram um crescente aumento (pão > massa > farinha), enquanto a amostra P4 (4.5% EM média) apresentou um aumento entre farinha e massa, porém, uma estabilidade na abundância relativa total em comparação com a massa (Figura 1C). Isso evidencia que a abundância dos compostos permaneceu constante; ainda, isso também pode estar relacionado com a maior proporção e maior superfície de contato das folhas de erva-mate adicionadas. Por outro lado, a diminuição é pronunciada na amostra de pão elaborado com 4,5% EMM (Figura 1C) comparado com as farinhas e as massas. Isso pode estar diretamente relacionado com as pequenas mudanças que ocorrem na estrutura do composto original, que impossibilita ser detectado pelo método de Folin-Cioacaltea (Tabela 1), enquanto foi possível observar a redução pelo método aplicado de espectrometria de massas.

Tabela 2. Compostos fenólicos livres e ligados mais abundantes identificados nas amostras de farinha, massa e pão com adição de erva-mate.

Nome	Fórmula molecular	<i>m/z</i>	TR (min)	Score (%)	PF (%)	Dados fragmentados (% intensidade relativa)	EM (ppm)	SI (%)	Classes
Isômero ácido Cafeoilquínico I	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0867	4,53	57,5	91,9	191.0561 (100.00%), 135.0451 (57.58%), 179.0349 (55.07%), 353.0878 (53.58%), 161.0244 (6.20%), 85.0295 (4.45%), 127.0400 (2.07%), 111.0451 (1.97%), 155.0350 (1.72%)	-3,1	99,3	AF
Ácido Cafeico	C₉H₈O₄	179,0338	6,28	52,1	69,4	135.0451 (100.00%), 117.0345 (2.36%)	-6,5	98,5	AF
Ácido 5-Cafoilquínico	C₁₆H₁₈O₉	353,0869	5,91	56,5	86,3	191.0561 (100.00%), 353.0878 (8.68%), 85.0295 (2.97%)	-2,5	99,3	AF
Isômero ácido Dicafeoilquínico II	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1190	8,73	53,5	69,2	135.0451 (100.00%), 161.0244 (9.88%), 335.0772 (2.76%)	-1,0	99,5	AF
Ácido Isoferulico	C₁₀H₁₀O₄	193,0495	8,03	44,2	28,6	193.0506 (52.08%), 149.0608 (61.72%), 151.0400 (33.02%), 163.0400 (29.60%), 117.0346 (18.59%), 109.0295 (17.75%), 123.0451 (15.34%), 129.0346 (13.34%), 175.0400 (13.04%), 161.0608 (12.29%)	-5,8	99,2	AF
Isômero ácido Dicafeoilquínico II	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0858	6,14	55,4	84,9	173.0455 (100.00%), 179.0349 (89.73%), 135.0451 (55.21%), 191.0561 (44.35%), 155.0350 (5.83%), 161.0244 (4.35%), 85.0295 (2.62%), 109.0295 (1.75%)	-5,8	98,8	AF
NID21	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1194	8,99	48,8	45,1	311.0772 (87.28%), 375.0721 (26.44%)	-0,2	99,0	AFD
Kaempferol 3,7- <i>o</i> -diglucosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1467	8,07	53,1	71,1	300.0275 (100.00%), 151.0037 (3.44%), 271.0278 (3.14%), 255.0299 (2.01%), 343.0459 (1.20%), 273.0404 (0.48%)	1,0	95,5	F
Isômero ácido Dicafeoilquínico I	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1190	8,55	52,6	64,8	179.0349 (76.03%), 515.1195 (33.27%), 353.0878 (29.56%), 161.0244 (17.88%), 335.0772 (7.36%), 109.0295 (5.40%), 123.0451 (2.99%), 203.0350 (1.94%), 91.0189 (1.38%)	-1,0	99,6	AF

Esculetina	C ₉ H ₆ O ₄	177,0179	6,14	52,4	72,4	153.0193 (100.00%), 148.0166 (6.56%), 104.0267 (5.92%), 135.0087 (4.85%), 67.0189 (4.35%), 120.0216 (2.05%)	-8,2	98,6	OP
Isômero ácido Feruloilquínico I	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,1020	6,08	56,4	87,8	193.0506 (100.00%), 111.04551 (35.65%), 367.1034 (33.93%), 149.0608 (11.32%), 117.0608 (7.60%)	-3,8	98,7	AF
Ácido <i>p</i>-Cumarico	C₉H₈O₃	163,0386	7,51	55,4	88,6	119.0502 (100.00%), 117.0346 (2.45%)	-9,1	98,7	AF
Isômero ácido Feruloilquínico II	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,1017	7,28	46,9	41,1	173.0455 (100.00%), 193.0506 (16.23%), 93.0345 (15.62%), 111.0451 (4.31%), 155.0350 (3.80%), 149.0608 (2.42%), 117.0346 (1.27%)	-4,7	99,0	AF
Ácido ferulico	C₁₀H₁₀O₄	193,0491	8,28	41,8	20,2	117.0346 (22.08%), 106.0424 (3.46%)	-7,8	97,2	AF
Luteolina 7- <i>o</i> -rutinosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1503	8,55	53,9	72,0	173.0455 (100.00%), 515.1192 (33.27%), 353.0878 (29.56%), 159.0451 (10.87%), 109.0295 (5.40%), 123.0451 (2.99%), 93.0345 (2.72%), 111.0451 (2.20%), 91.0189 (1.38%), 257.0455 (0.51%), 327.0510 (0.34%)	-1,5	99,3	F
Isômero Apigenina 7- <i>o</i> -apiosil- glucosídeo II	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563,1406	7,53	57,7	90,3	563.1406 (100.00%), 353.0667 (74.95%), 383.0772 (45.92%), 443.0983 (12.86%), 473.1089 (6.94%), 365.0667 (2.18%), 503.1195 (2.00%), 413.08787 (1.83%), 425.0878 (1.82%), 397.0928 (0.82%)	0,0	98,1	F
Ácido <i>p</i> -Cumaroilquínico	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337,0907	6,90	43,1	22,8	119.0502 (100.00%), 117.0502 (11.92%)	-6,4	99,7	AF
Ácido 4-hidroxifenilglicólico / ácido 3,4-dihidroxifenilacético	C ₈ H ₈ O ₄	167,0338	3,01	56,3	90,6	166.0271 (100.00%), 123.0451 (76.93%)	-6,9	98,7	AF
Isômero Apigenina 7- <i>o</i> -apiosil- glucosídeo I	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563,1379	7,32	50,8	61,7	353.0667 (60.44%), 443.0983 (12.31%), 473.1089 (7.96%), 325.0717 (2.07%), 365.0667 (1.43%)	-4,9	97,6	F
Ácido rosmarínico	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359,0753	6,30	40,8	13,9	135.0451 (100.00%), 117.0345 (2.36%)	-5,3	96,0	AF

m/z: massa/carga. TR: tempo de retenção. PF: pontuação de fragmentação. SI: semelhança isotópica. EM: erro em massa. Negrito representa padrões de referência. Classes: AF: ácidos fenólicos. F: flavonoides; AFD: ácidos fenólicos derivados. OP: outros polifenóis.

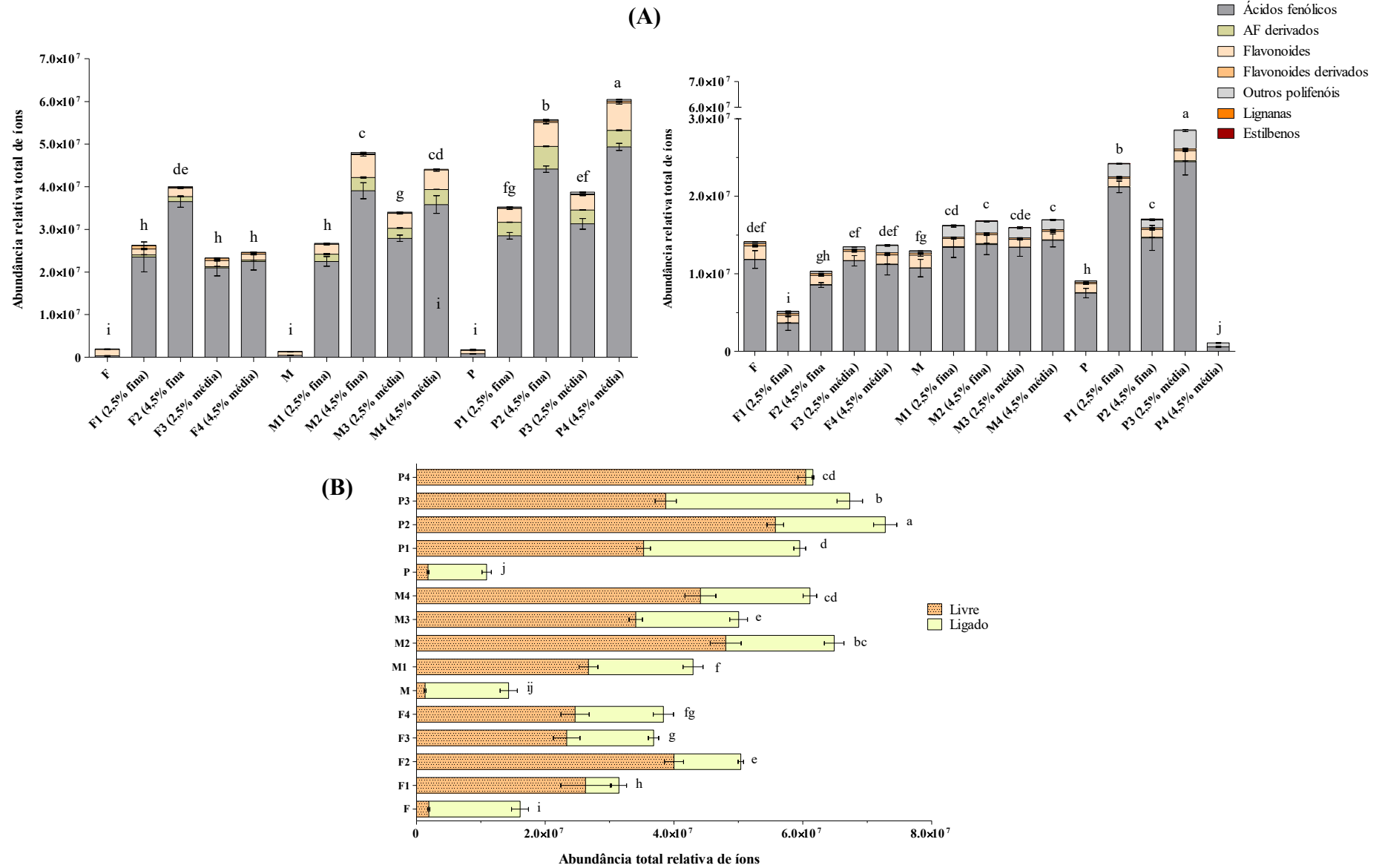
De acordo com Santetti *et al.* (2021b), durante o processo fermentativo de massas elaboradas com erva-mate novos compostos foram liberados para a matriz, o que pode ter contribuído na manutenção dos compostos após o forneamento. Tian *et al.* (2021) também descobriram que o cozimento do pão pode favorecer a liberação de compostos fenólicos, explicando as mudanças na composição fenólica durante o processo de panificação. Além de ligações dissulfeto covalentes (S-S), os polifenóis podem formar complexos com as proteínas do trigo por meio de ligações de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas (YUAN *et al.*, 2021). A formação desses complexos a base de proteína pode explicar a presença de compostos fenólicos mesmo após o cozimento do pão (ANGELINO *et al.*, 2017).

A Figura 2A compara a abundância relativa de fenólicos livres e ligados para todas as amostras. É possível observar que a fração ligada é mais abundante nas amostras controle (FTI), enquanto as amostras incorporadas de erva-mate apresentam a fração livre como a mais abundante (Figura 2B). Esses dados corroboram com os resultados que foram encontrados na análise de redutores do reagente de Folin-Ciocalteu, assim como demonstraram que o maior efeito após a incorporação da farinha de erva-mate nos compostos fenólicos foi encontrado na forma livre. Além do efeito positivo da fração livre, as amostras M2, M4, P2 e P4, cuja a proporção de 4,5% de erva-mate foi incorporada, apresentaram maiores abundâncias relativas de compostos fenólicos ($p < 0,05$), independentemente do tamanho da partícula da EM. Isso evidencia a importância de adicionar na matriz uma fonte externa de compostos fenólicos para melhorar o conteúdo de fenólicos livres.

Considerando a abundância das classes, diferente do encontrado no número de identificações, a classe de ácidos fenólicos foi a mais abundante em todas as amostras e em ambos os extratos (livres e ligados). Ou seja, embora essas amostras apresentem uma maior diversidade de moléculas pertencentes à classe de flavonóides, o teor em ácidos fenólicos presentes é superior.

Na Figura 2B é possível visualizar a abundância relativa total de compostos fenólicos em cada amostra (farinha, massa e pão), e em ambas as formas (livre e ligado). A amostra de pão P2 (4,5% EMF) apresentou a maior abundância de compostos fenólicos entre todas as amostras, seguida de P3 (2,5% EMM). Enquanto que nas amostras de massa M2 e M4 (4,5% EMF e EMM) os compostos foram mais abundantes quando comparadas com as outras amostras de massa. Entre as farinhas, a amostra F2 (4,5% EMF) foi a que apresentou a maior abundância relativa total comparado as outras amostras de farinha.

Figura 2. Abundância relativa total de íons de classes e extratos livres e ligados (A) e a soma da abundância relativa de íons para os extratos livres e ligados das amostras de farinha, massa e pão (B).



Letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$) e barras representam o desvio padrão.

A diferenciação na abundância dos compostos fenólicos entre as amostras e a notável presença destes compostos nas amostras de pão após o cozimento, pode ser atribuída a ruptura da matriz durante o processamento térmico, como é o caso do forneamento do pão e a formação de novos compostos devido as reações de *Maillard* (ANGELINO *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2020). Dominguéz-Fernández *et al.* (2021) relataram que durante o cozimento de pães os ácidos clorogênicos (ou ácido 5-cafeoilquínico) podem se ligar a estrutura das melanoidinas via ligações covalentes. Esta reação permite que os compostos fenólicos do pão sejam quantificados, e neste estudo eles estão presentes, principalmente na forma livre (compostos número 55,60,62,75 e 76 da Tabela 1 do APÊNDICE C).

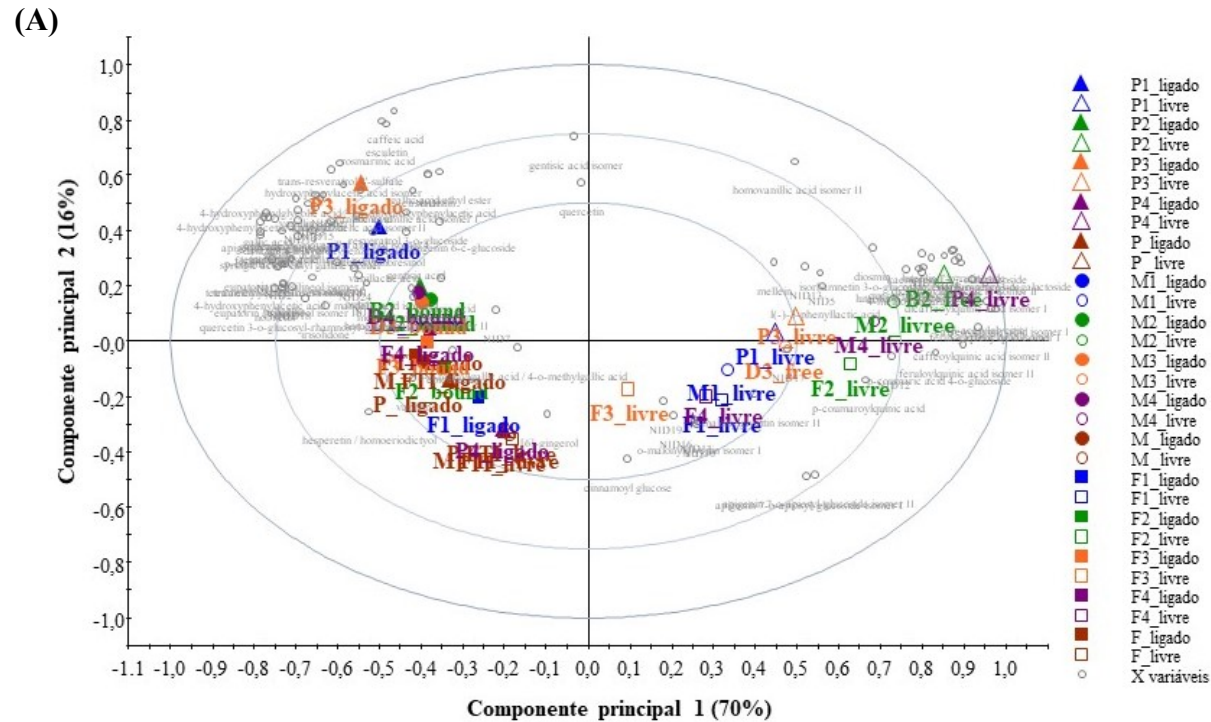
Além disso, durante a produção de pães a transferência de calor para o centro do produto é relativamente lenta, portanto, os compostos podem não serem degradados (BUREŠOVÁ *et al.*, 2021). Ainda, os fenólicos livres podem formar ligações entre as proteínas, o que conseqüentemente leva a formação de novos compostos através das reações de condensação. Por exemplo, os quininos presentes nas folhas e caules da EM podem reagir com os grupos sulfidrilas (S-H) e amino das proteínas, favorecendo a sua identificação no pão (OZDAL *et al.*, 2013).

3.3 Análises multivariadas para discriminação do perfil fenólico nas amostras de farinha, massa e pão

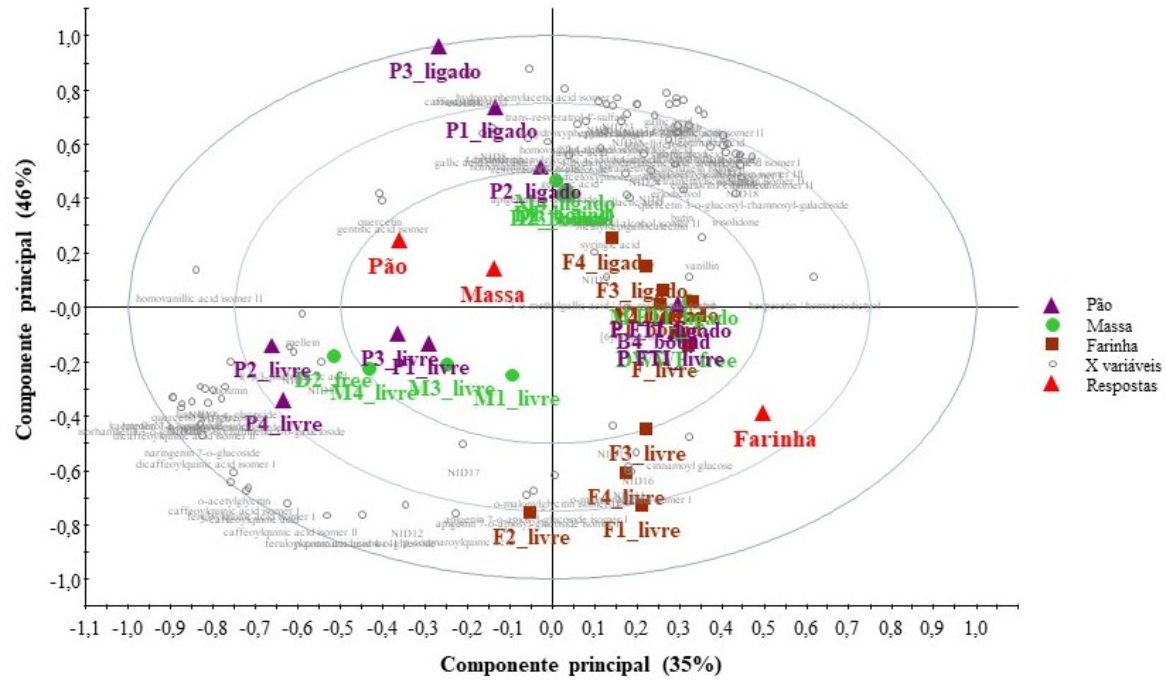
Para melhor compreensão do comportamento dos compostos fenólicos durante o processamento do pão, o perfil fenólico das amostras de farinha, massa e pão com adição de erva-mate, bem como as amostras controles, foram analisadas por análises estatísticas multivariadas (ACP e HCA).

O grau de similaridade dos extratos (livres e ligados) foram evidenciados através de análise de PCA bliplot (escores: amostras; cargas: compostos fenólicos) das amostras de farinha, massa e pão (Figura 3A). Os dois componentes principais (PC1 e PC2) explicaram 86% da variância total, com uma clara distinção entre os perfis de compostos fenólicos presentes nas formas livres e ligadas, quando todas as amostras foram comparadas. O PC1 explicou a maioria dos dados (70%) e o PC2 explicou 16% da dispersão total. Além disso, para as amostras P1 e P3 o perfil de compostos fenólicos ligados foram mais distintos comparado as outras amostras.

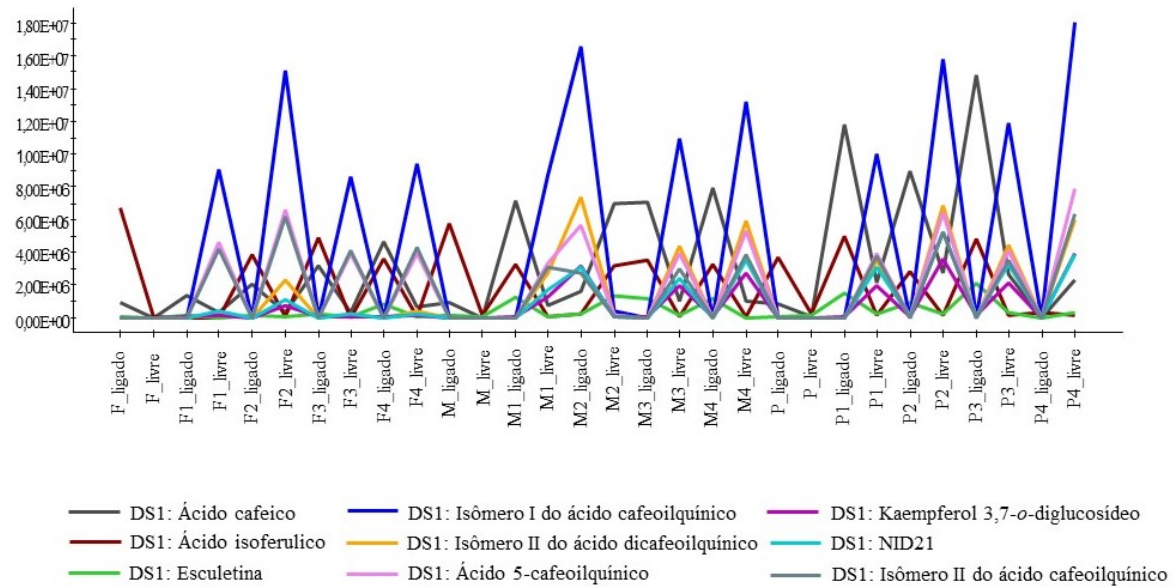
Figura 3. Análise de PCA (A) e PLS (B) dos compostos identificados nas amostras. A pontuação (amostras representadas pelo símbolo) é distribuída de acordo com a abundância relativa de íons dos compostos fenólicos identificados (círculos cinzas). (C) Compostos discriminados por análise projeção de importância variável nas amostras de farinha, massa e pão.



(B)



(C)



No segundo PCA, as amostras foram agrupadas em farinha, massa e pão para realizar um PLS (Figura 3B). Neste caso, os dois componentes principais (PC1 e PC2) explicaram 81% da variância total. A aproximação das amostras de massa e pão foi observada, devido à grande similaridade dos perfis de compostos fenólicos, enquanto que as amostras de farinha apresentaram um perfil mais distinto. Isto pode estar associado à transformação de compostos fenólicos durante o processo de panificação, notadamente nas etapas de fermentação e cocção, que pode auxiliar na diferenciação entre estes dois grupos (ANGELINO *et al.*, 2017; SANTETTI *et al.*, 2021a).

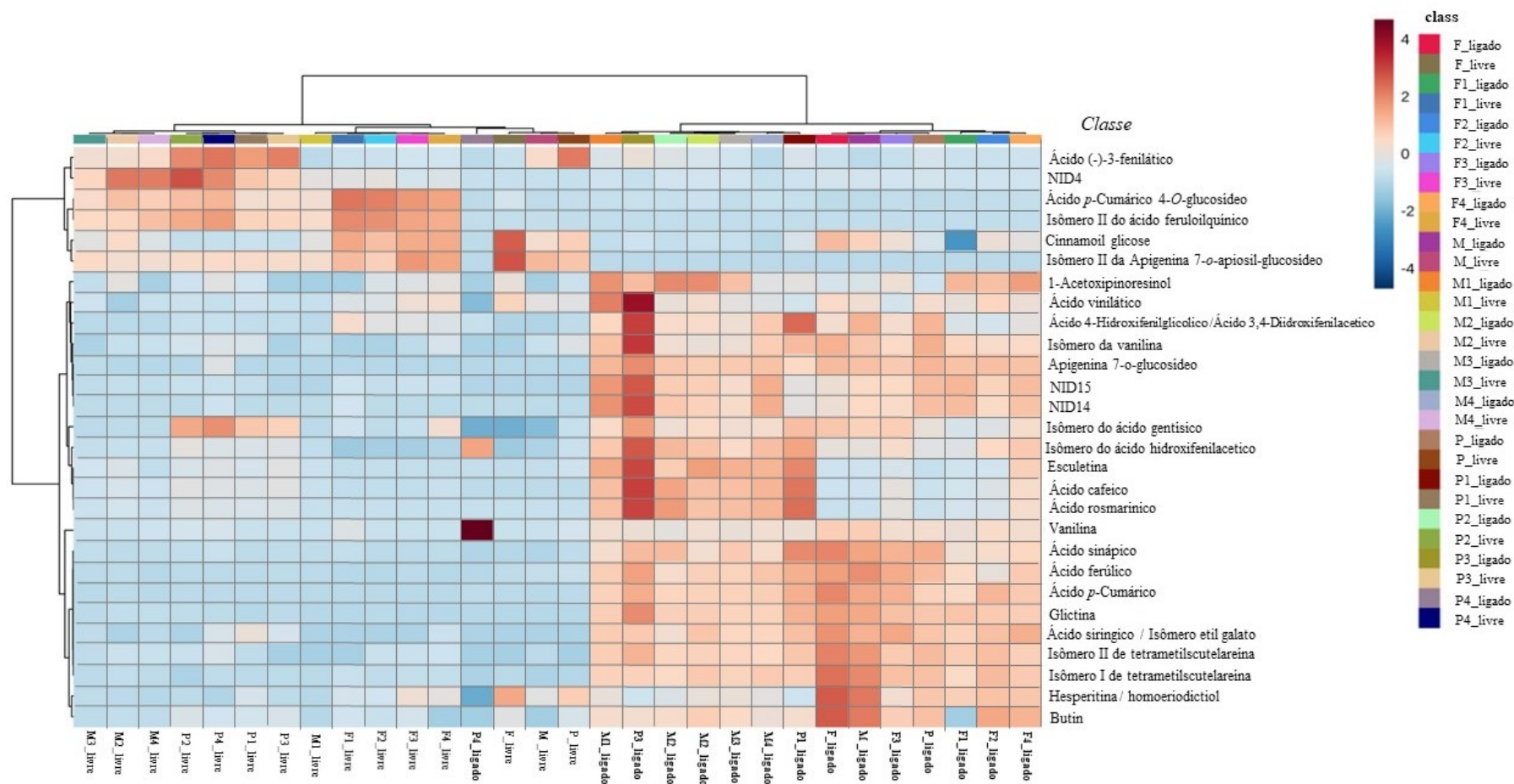
Ademais, os compostos que mais poderiam influenciar na diferenciação das amostras foram estimados pelo método de importância variável na projeção (VIP), obtido a partir da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) (Figura 3C). Alguns destes compostos foram encontrados nas amostras contendo erva-mate, sendo eles: ácido cafeico, isômero ácido cafeoilquínico I, isômero ácido dicafeoilquínico II, ácido 5-cafeoilquínico e isômero ácido cafeoilquínico II. Estes compostos fenólicos têm sido reportados como sendo os majoritários da EM (MATEOS *et al.*, 2018; KALTBACH *et al.*, 2020; BUTIUK *et al.*, 2021; CHEMINET *et al.*, 2021), o que explica a diferença em relação as amostras sem ou com menores proporções de EM. Estes compostos e os isômeros podem estar presentes devido às transformações que ocorrem durante a fermentação da massa de pão. Leonard e colaboradores (2021) relataram que a biotransformação dos ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido cafeico, pode ocorrer devido às enzimas descarboxilases ou redutases durante o processo de fermentação com a levedura.

Por outro lado, ácidos isoferúlico, ferúlico e *p*-cumárico, considerados os mais abundantes em trigo (SANTOS *et al.*, 2019), foram identificados nas amostras controle de farinha, massa e pão. Em todos os extratos das amostras incorporadas com EM foi possível observar a presença de diferentes estruturas do ácido clorogênico, enquanto que nos extratos ligados os compostos mais abundantes foram os ácidos fenólicos simples, como ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico e ácido cafeico.

A Figura 4A apresenta o HCA e o mapa de calor para os grupos selecionados dos extratos livres e ligados. O número total de 28 compostos em comum nos extratos livres e ligados incluem o ácido isoferúlico, vanilina e ácido sinápico. Na distribuição e variação da abundância relativa destes compostos para cada amostra de acordo com a intensidade de cor, observou-se uma grande variação entre os extratos de fenólicos livres e ligados. A maior prevalência dos compostos selecionados foi encontrada na forma ligada. Alguns

compostos foram identificados em maior abundância nas amostras de pão e no extrato ligado, incluindo o ácido rosmarínico, ácido cafeico, esculetina e apigenina 7-*O*-glucosídeo. Durante o processo de panificação, muitos compostos fenólicos podem estar envolvidos na formação e produtos da reação de *Maillard*, o que leva um aumento no conteúdo fenólico (DOMINGUÉZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2021). Além disso, esse aumento pode ser devido à temperatura utilizada no cozimento do pão, resultando na liberação de fenólicos ligados que estão presentes na parede celular ou até mesmo na conversão de fenólicos livres em fenólicos ligados por meio de reações de condensação com proteínas e açúcares através de ligações de hidrogênio e água (LI *et al.*, 2020). De acordo com Alves e Perrone (2015), os compostos fenólicos ligados são facilmente incorporados na estrutura das melanoidinas. Isso corrobora com os resultados deste estudo, no qual as maiores frações de fenólicos estavam presentes na forma ligada podendo estar ligadas por meio de ligações éster ou glicosídicas.

Figura 4. Análise de agrupamento hierárquico (HCA) e mapa de calor de compostos fenólicos livres e ligados em amostras de farinha, massa e pão preparadas com adição de erva-mate.



M: massa de farinha de trigo integral. P: pão de farinha de trigo integral. M1 e M2: massa elaborada com 2,5 e 4,5% de EM fina (m/m). M3 e M4: massa elaborada com 2,5 e 4,5% de EM média (m/m). P1 e P2: pão elaborado com 2,5 e 4,5% de EM fina (m/m). P3 e P4: pão elaborado com 2,5 e 4,5% de EM média (m/m).

A amostra P4 (extrato fenólico ligado) apresenta em maior abundância o composto fenólico vanilina, e isso pode ser atribuído pela temperatura de forneamento do pão. De acordo com Călinoiu e Vodnar (2019) o aumento desse composto após o cozimento é provavelmente devido a ligações particulares e à posição entre as partes da parede celular e os ácidos fenólicos. Ainda, o ácido cafeico foi predominante em amostras de massa e pão com adição de erva-mate, uma vez que, é um dos compostos majoritários das folhas de erva-mate (BRACESCO *et al.*, 2011).

Em resumo, os perfis fenólicos foram distintos para todas as amostras estudadas, já que a adição de erva-mate aumentou a abundância de compostos. Ainda, o processamento do pão, considerando algumas etapas como o cozimento, pode ser um fator importante quando se buscar aumentar o conteúdo de compostos fenólicos, já que muitos são liberados com a ruptura da parede celular ocasionado pelo aumento de temperatura.

4 CONCLUSÃO

Este estudo elucidou e avaliou pela primeira vez o perfil de compostos fenólicos em amostras de farinha, massa e pão integral, elaborados com a incorporação de erva-mate. Os resultados demonstraram o efeito do processamento do pão no perfil fenólico utilizando ferramentas metabolômicas robustas. As amostras incorporadas com EM apresentaram grande diversidade de compostos fenólicos em comparação as amostras controle. As amostras de massa e pão com a maior proporção de EM (4,5%) apresentaram um perfil mais abundante de compostos fenólicos quando comparado as farinhas.

O processo de fermentação e cozimento pode auxiliar na liberação de compostos fenólicos. As análises estatísticas multivariadas demonstraram que os principais compostos fenólicos se apresentaram na forma livre, possivelmente pela ação da temperatura de forno e pelo processo fermentativo, ocasionando a ruptura de ligações químicas entre os compostos e a matriz.

A adição de erva-mate na farinha de trigo integral para a panificação oferece potenciais benefícios, devido a presença de diversos compostos fenólicos de diferentes classes. Ainda, mesmo com a incorporação de uma baixa concentração de folhas de erva-mate no pão (< 5%; m/m), o aumento dos compostos foi pronunciado e as propriedades tecnológicas foram mantidas. Assim, esta é uma estratégia viável para o enriquecimento de produtos de panificação, promovendo possíveis benefícios a saúde dos consumidores e potencializando o uso de um produto regional.

REFERÊNCIAS

- ARIGÒA, A. *et al.* Development of extraction method for characterization of free and bonded polyphenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) grown in Czech Republic using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.245, p.829–837, 2018.
- ACOSTA-ESTRADA, B.A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J.A.; SERNA-SALDIVAR, S.O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v.152, p.46-55, 2014.
- ANGELINO, D. *et al.* Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in bread: a review. **Food & Function**, v.8, p.2368-2393, 2017.
- ANTOIGNONI, F. *et al.* Changes in carotenoids, phenolic acids and antioxidant capacity in bread wheat doughs fermented with different lactic acid bacteria strains. **Food Chemistry**, v.292, p.211–216, 2019.
- ALVES, G., PERRONE, D. Breads enriched with guava flour as a tool for studying the incorporation of phenolic compounds in bread melanoidins. **Food Chemistry**, v.185, p.65-74, 2015.
- BUTIUK, A.P. *et al.* Optimization and modeling of the chlorogenic acid extraction from a residue of yerba mate processing. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v.25, p.100329, 2021.
- BUREŠOVÁ, B. *et al.* Changes in carotenoids and tocopherols of colored-grain wheat during unleavened bread preparation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.103, p.104108, 2021.
- BRESSIANI, J. *et al.* Properties of whole grain wheat flour and performance in bakery products as a function of particle size. **Journal of Cereal Science**, v.75, p.269-277, 2017.
- BRACESCO, N. *et al.* Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v.136, p.378–384, 2011.
- BRITES, L.T.G.F. *et al.* Technological, sensory, nutritional and bioactive potential of pan breads produced with refined and whole grain buckwheat flours. **Food Chemistry**, v.13, p.100243, 2022.
- CALINOIU, L.F. ; VODNAR, D.C. Thermal processing for the release of phenolic compounds from wheat and oat bran. **Biomolecules**, v.10, p.1-14, 2020.
- ÇELİK, E.E.; GÖKMEN, V. Effects of fermentation and heat treatments on bound-ferulic acid content and total antioxidant capacity of bread crust-like system made of different whole grain flours. **Journal of Cereal Science**, v.93, p.102978, 2020.
- CHEMINET, G.; BARONI, M.V.; WUNDERLIN, D.A. Antioxidant properties and phenolic composition of "Composed Yerba Mate". **Journal of Food Science and Technology**, v.58, p.4711–4721, 2021.

DOMÍNGUEZ-FERNÁNDEZ, M. *et al.* Influence of culinary process on free and bound (poly)phenolic compounds and antioxidant capacity of artichokes. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v.25, p.100389, 2021.

DRAKULA, S. *et al.* Alteration of phenolics and antioxidant capacity of gluten-free bread by yellow pea flour addition and sourdough fermentation. **Food Bioscience**, v.44, p.101424, 2021.

GAN, R. *et al.* Health benefits of bioactive compounds from the genus *Ilex* a source of traditional caffeinated beverages. **Nutrients**, v.10, p.1682, 2018.

GENG, P.; HARNLY, J.M.; CHEN, P. Differentiation of bread made with whole grain and refined wheat (*T. aestivum*) flour using LC/MS-based chromatographic fingerprinting and chemometric approaches. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.47, p.92-100, 2016.

GERM, M. *et al.* The temperature threshold for the transformation of rutin to quercetin in tartary buckwheat dough. **Food Chemistry**, v.283, p.28-31, 2019.

KALTBACH, P. *et al.* New HPTLC methods for analysis of major bioactive compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.92, p.103568, 2020.

LEONARD, W. *et al.* Fermentation transforms the phenolic profiles and bioactivities of plant-based foods. **Biotechnology Advances**, v.49, p.107763, 2021.

LI, M. *et al.* Effect of thermal processing on free and bound phenolic compounds and antioxidant activities of hawthorn. **Food Chemistry**, v.332, p.127429, 2020.

MARTINS, Z. E.; PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O. Food industry by-products used as functional ingredients of bakery products. **Trends in Food Science & Technology**, v.67, p.106-128, 2017.

MATEOS, R. *et al.* Improved LC-MSⁿ characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.241, p.232-241, 2018.

NING, J. *et al.* Effect of green tea powder on the quality attributes and antioxidant activity of whole-wheat flour pan bread. **LWT – Food Science and Technology**, v.79, p.342-348, 2017.

NOOSHKAM, M. *et al.* The *Maillard* reaction products as food born antioxidant and antibrowning agents model and real food systems. **Food Chemistry**, v.275, p.644-660, 2019.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v.51, p.954-970, 2013.

OU, J. *et al.* Positive and negative effects of polyphenol incorporation in baked foods. **Food Chemistry**, v.284, p.90-99, 2019.

PALERMO, M.; PELLEGRINI, N.; FOGLIANO, V. The effect of cooking on the phytochemical content of vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.94, p.1057-1070, 2014.

RANI, P. *et al.* Impact of fermentation and extrusion processing on physicochemical, sensory and bioactive properties of rice-black gram mixed flour. **LWT - Food Science and Technology**, v.89, p.155-163, 2018.

SANTOS, M.C.B. *et al.* Metabolomic approach for characterization of phenolic compounds in different wheat genotypes during grain development. **Food Research International**, v.124, p.118-128, 2019.

SANTETTI, G.S. *et al.* The addition of yerba mate leaves on bread dough has influences on fermentation time and the availability of phenolic compounds? **LWT – Food Science and Technology**, v.146, p.111442, 2021a.

SANTETTI, G.S. *et al.* Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves on dough properties, antioxidant activity, and bread quality using whole wheat flour. **Journal of Food Science**, v.86, p.4354-4364, 2021b.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.

SUMNER, L.W. *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. **Metabolomics**, v.3, p.211-221, 2007.

SHAHIDI, F.; YEO, J. Insoluble-Bound Phenolics in Food. **Molecules**, v.21, p.1216, 2016.

TIAN, W. *et al.* Changes in phenolic profiles and antioxidant activities during the whole wheat flour bread-making process. **Food Chemistry**, v.345, p.128851, 2021.

VALLI, V. *et al.* Health benefits of ancient grains. Comparison among bread made with ancient, heritage and modern grain flours in human cultured cells. **Food Research International**, v.107, p.206–215, 2018.

VERARDO, V. *et al.* Determination of free and bound phenolic compounds and their antioxidant activity in buckwheat bread loaf, crust and crumb. **LWT - Food Science and Technology**, v.87, p.217-224, 2018.

YUAN, W. *et al.* Baking intervention for the interaction behaviours between bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) leaf flavonoids and gliadin. **Industrial Crops & Products**, v.164, p.113385, 2021.

XU, J.; WANG, W.; LI, Y. Dough properties, bread quality, and associated interactions with added phenolic compounds: A review. **Journal of Functional Foods**, v.52, p.629-639, 2019.

XU, K. *et al.* Okra seed and seedless pod: Comparative study of their phenolics and carbohydrate fractions and their impact on bread-making. **Food Chemistry**, v.317, p.126387, 2020.

ŽILIC, S. *et al.* Effects of infrared heating on phenolic compounds and *Maillard* reaction products in maize flour. **Journal of Cereal Science**, v.58, p.1-7, 2013.

CAPÍTULO 5

BIOACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE PÃES INTEGRAIS ADICIONADOS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) DURANTE SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

Gabriela Soster Santetti^a, Marina Volpato Dacoreggio^a, Isabel Cristina da Silva Haas^a,
Barbara Biduski^b, Rodrigo Barcellos Hoff^c, Telma Elita Bertolin^b, Luiz Carlos
Gutkoski^d, Carlise Beddin Fritzen Freire^a, Renata Dias de Mello Castanho Amboni^{a*}

^aDepartamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rodovia Admar Gonzaga 1346, 88034-000, Florianópolis, SC, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 99052-900, Brazil.

^cMinistério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (MAPA), São José, SC, 88102-600, Brazil..

^dLaboratório de Bioativos, Programa Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Av. Pasteur, 296, Urca, 22290-240, Rio de Janeiro, Brazil.

RESUMO

O estudo investigou o efeito da adição de erva-mate (EM) no perfil fenólico, capacidade antioxidante e bioacessibilidade fenólica de pães integrais utilizando uma simulação gastrointestinal *in vitro*. Três pães foram elaborados, P FTI (sem EM), P1 e P2 (2,5 e 4,5% EM, respectivamente). Alguns compostos fenólicos dos pães apresentaram potencial bioacessível, como ácido clorogênico, benzoico, siríngico, *p*-cumárico e siringaldeído. A fase gástrica apresentou diferentes compostos bioacessíveis para cada amostra, como ácido ferúlico para P FTI, rutina, ácido clorogênico e *p*-cumárico para P1 e P2. O perfil fenólico demonstrou que a concentração de alguns compostos na fase intestinal reduziu significativamente, devido à alcalinidade no meio e ação das enzimas pancreáticas. A PCA indicou maior associação dos compostos fenólicos (ácido ferúlico, clorogênico e *p*-aminobenzoico para P1, P2 e P FTI) com a fase oral. A adição de EM contribuiu para o aumento na bioacessibilidade dos compostos fenólicos, possibilitando a inclusão de um produto natural valorizando uma planta regional.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, bioacessibilidade, compostos bioativos, produtos de panificação, farinha de trigo integral.

ABSTRACT

The study investigated the effect of addition of yerba mate (YM) on phenolic profile, antioxidant capacity, and phenolic bioaccessibility of whole bread using an *in vitro* gastrointestinal digestion. Three samples were prepared, B WWF (without YM), B1 and B2 (2.5 and 4.5% YM, respectively). Some phenolic compounds in breads showed bioaccessible potential, such as chlorogenic, benzoic, syringic, *p*-coumaric and syringaldehyde acid. Gastric phase presented different bioaccessible compounds for each sample, such as ferulic acid (B WWF), rutin, chlorogenic and *p*-coumaric acid (B1 and B2). The phenolic profile demonstrated that the concentration of some compounds in the intestinal phase reduced significantly, due to alkalinity in middle and action of pancreatic enzymes. PCA indicated a greater association of phenolic compounds (ferulic, chlorogenic and *p*-aminobenzoic acid for B1, B2 and BWWF) in oral phase. The addition of YM contributed to the increase in the bioaccessibility of phenolic compounds, allowing the inclusion of natural product valuing a regional plant.

Keywords: *Ilex paraguariensis*, bioaccessibility, bioactive compounds, bakery products, whole wheat flour.

1. INTRODUÇÃO

O consumo de farinhas de trigo integrais, como também a incorporação de ingredientes naturais no desenvolvimento de novos produtos alimentícios tem aumentado nos últimos anos (TIAN *et al.*, 2021a). Nesse contexto, os produtos de panificação como pães, biscoitos e massas, são excelentes alternativas para a incorporação destes antioxidantes naturais como ervas, plantas e frutas (BAÇZEK *et al.*, 2020; TIAN *et al.*, 2021a). Contudo, para compreender de que forma o produto alimentício irá apresentar os potenciais benéficos para a saúde, a liberação e a solubilização dos fenólicos da matriz alimentar no sistema digestivo humano deve ser investigada, uma vez que apenas os compostos fenólicos solúveis conseguem ser potencialmente bioacessíveis (TIAN *et al.*, 2021b).

Estudos anteriores demonstram que as plantas, como a erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), podem ser utilizadas no desenvolvimento de produtos panificáveis, atuando como ingrediente funcional (SARAIVA *et al.*, 2019; SANTETTI *et al.*, 2021a; CHEMINET *et al.*, 2021). A erva-mate é conhecida pelas suas propriedades farmacológicas, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, hipocolesterolêmica e antitumoral (PETRILLI *et al.*, 2016; FERRARIO *et al.*, 2018; BRACESCO, 2019; VARGAS *et al.*, 2021). Essas propriedades benéficas estão associadas ao seu elevado conteúdo de compostos fenólicos, encontrados principalmente em suas folhas (SANTETTI *et al.*, 2021b). Em nosso estudo anterior verificou-se que a incorporação de folhas de erva-mate aumentou o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de pães (SANTETTI *et al.*, 2021a). Ainda, em outro estudo do nosso grupo de pesquisa, foi observado que as etapas do processo de panificação, como a mistura, a fermentação e a cocção, têm influência na liberação de compostos fenólicos, sendo que o processo fermentativo atuou na liberação de novos compostos fenólicos para a matriz, tais como ácido gálico, ácido ferúlico, quercetina, isoquercetina (SANTETTI *et al.*, 2021b).

De fato, a simples ingestão de uma dieta rica em fitoquímicos não garante seus efeitos benéficos ao organismo, uma vez que esses compostos podem ser alterados pelo processamento do produto, como também durante a passagem pelo trato gastrointestinal humano de diferentes formas, refletindo, conseqüentemente, na atividade biológica (AYLANC *et al.*, 2021). Assim, a simulação gastrointestinal *in vitro* é uma ferramenta útil que possibilita investigar o efeito da digestão sobre a bioacessibilidade de compostos fenólicos, obtendo dados que possam apoiar as afirmações de relevância nutracêutica para

a saúde humana. A bioacessibilidade pode ser definida como a fração de um composto que é liberada da matriz alimentar para o trato gastrointestinal, tornando-se assim disponível para a absorção intestinal, e por fim promovendo benefícios ao organismo humano (BLANCO CANALIS *et al.*, 2020).

Durante o processo digestivo, diversos fatores físicos e químicos (temperatura, pH e força iônica) e bioquímicos (sais biliares e enzimas) influenciam diretamente na estabilidade dos polifenóis, bem como a liberação destes da matriz alimentar, que é afetada pela interação existente entre elas (SEÇZYK *et al.*, 2021). Assim, a absorção dos compostos fenólicos pode ser influenciada pela sua estrutura química ou pela sua solubilidade, pela interação com outros ingredientes da matriz alimentar, transformações moleculares, diferentes transportes celulares, metabolismo e possível interação com a microbiota intestinal (PODIO *et al.*, 2019). Geralmente, os compostos fenólicos insolúveis possuem baixa bioacessibilidade durante a digestão gastrointestinal, enquanto os fenólicos solúveis (livres) podem ser potencialmente bioacessíveis (TIAN *et al.*, 2021b).

Diante do exposto, hipotetizamos que o pão integral elaborado com erva-mate pode promover benefícios à saúde, visto que os compostos fenólicos podem estar bioacessíveis em altas concentrações no organismo dos consumidores deste produto. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar o comportamento do perfil fenólico, atividade antioxidante e bioacessibilidade dos compostos fenólicos durante uma simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* de pães integrais com erva-mate.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

As folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) da safra 2017 e os grãos de trigo (*Triticum aestivum* L.) da cultivar Toruk, e da safra 2017/18 foram gentilmente fornecidas pela Inovamate (Ilópolis, Brasil) e pela Biotrigo Genética-Ltda (Passo Fundo, Brasil), respectivamente. Os ingredientes para a preparação dos pães foram adquiridos em mercado local. Todos os reagentes químicos são de grau analítico. Etanol, n-hexano, acetato de etila, hidróxido de sódio (NaOH), e ácido clorídrico (HCl), foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os padrões analíticos (pureza $\geq 95\%$) de apigenina, isorhamnetina, pinobanksina, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido *p*-aminobenzóico, ácido *p*-cumárico, 4-metilumbeliferona, ácido vanílico, rutina, naringina, (+) -catequina, sinapaldeído, ácido cafeico, ácido clorogênico, coniferaldeído, siringaldeído, crisina, hesperidina, ácido siringico, kaempferol, naringenina, (-)-epicatequina, pinocembrina, galangina, ácido salicílico, quercetina, ácido gálico, ácido benzoico, ácido 3,4-dihidroxibenzóico e luteolina foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Dimetilsulfóxido de grau HPLC (DMSO), metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha), e o ácido fórmico de grau HPLC foi adquirido da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). A enzima α -amilase foi obtida do *Aspergillus oryzae* (A10065; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), a pepsina da mucosa gástrica suína (P7125; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), a pancreatina do pâncreas suíno (P7545; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), os sais biliares (hidrato de taurocolato de sódio, glicodesoxicolato de sódio e hidrato de taurodesoxicolato de sódio), e os reagentes DPPH (1,1- difenil-2-picrilidrazil), ABTS⁺ [2,2-azino-bis (ácido 3- etilbenzotiazolina- 6-sulfônico)], Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman- 2-carboxílico) e Folin-Ciocalteu foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

2.2 Preparação da farinha de trigo integral, folhas de erva-mate e amostras de pão

A farinha de trigo integral (FTI) e as folhas de erva-mate (EM) foram preparadas conforme descrito em um estudo anterior, assim como a proporção e tamanho de partícula

da EM selecionadas para a incorporação (SANTETTI *et al.* 2021a). Para este estudo, o tamanho médio de partícula da EM utilizado foi de 245 μm .

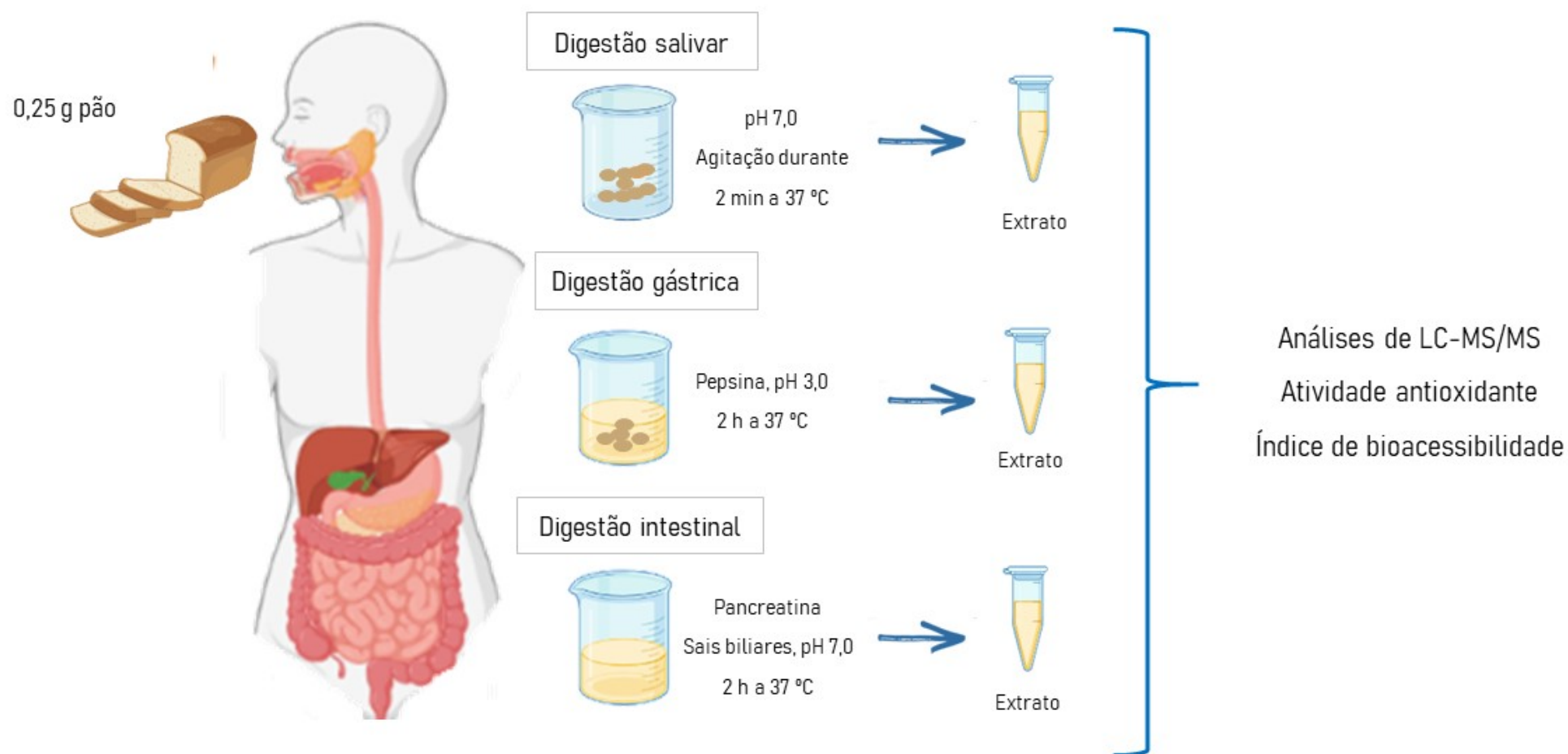
Três pães foram preparados: P1 e P2 (2,5 e 4,5 g EM/100 g FTI; m/m), e uma amostra controle sem adição de EM (P FTI). Os pães foram preparados utilizando o teste instrumental em pequena escala seguindo o método descrito por Bressiani *et al.* (2017). Os métodos oficiais da ACCI Internacional (2010) foram utilizados para determinar a composição físico-química dos pães, incluindo teor de umidade (44-15.02), cinzas (08-12.01), proteínas (46-10.01), lipídios (30-20.01) e fibra alimentar (32-07.01). A atividade de água (a_w) foi medida utilizando um analisador de atividade de água (Testo, 650, Alemanha) em temperatura ambiente (25 °C). Estes resultados estão apresentados na Tabela 1 (APÊNDICE D). Antes da realização das análises, os pães foram liofilizados por 48 h e moídos até passar numa peneira de 30 mesh.

2.3 Simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal de pães

A simulação estática da digestão gastrointestinal *in vitro* foi realizada conforme metodologia descrita por Minekus *et al.* (2014). A Figura 1 ilustra o esquema da análise de digestão *in vitro*. Resumidamente, a digestão consistiu em três fases, denominadas fases oral, gástrica e intestinal. As amostras controles para as três amostras de pães (P FTI, P1 e P2) foram submetidas às mesmas condições de digestão *in vitro* (tempo e temperatura), mas sem a presença das enzimas (α -amilase, pepsina, pancreatina) e sais biliares (hidrato de taurocolato de sódio, glicodesoxicolato de sódio e hidrato de taurodesoxicolato de sódio). Na fase oral (digestão salivar), foi utilizado 0,25 g de amostra (sólida), adicionados de fluido salivar (pH 7,0) e enzima α -amilase (75 U/mL). A mistura foi submetida a banho de aquecimento (37 °C) e agitação por 2 min. Após o estágio I da digestão as amostras foram submetidas a fase gástrica. Nesta fase, o fluido gástrico (pH 3,0), a pepsina (2000 U/mL) e o sal CaCl_2 (0,075 mol/L) foram adicionados na mistura, a qual foi mantida em banho termostático a 37 °C por 2 h. Após o estágio II da digestão a mistura foi submetida a fase intestinal. Foram adicionados o fluido intestinal, a pancreatina (800 U/mL), os sais biliares (10 mol/L) e o sal CaCl_2 (0,3 mol/L). Nesta fase o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 M, e submetido à incubação em banho termostático a 37 °C por 2 h. Ao final de cada fase da digestão foi retirada uma alíquota e realizada a centrifugação (2.480 g por 10 min a 25 ± 2) (Hermle Z200A, Wehingen,

Alemanha). O sobrenadante foi coletado e analisado diretamente no sistema de LC-MS/MS (ver item 2.6).

Figura 1. Esquema do processo de simulação gastrointestinal *in vitro*.



Fonte: Próprio Autor (2022)

2.4 Bioacessibilidade de compostos fenólicos

O efeito da digestão *in vitro* na composição dos compostos fenólicos individuais das amostras de pão (com e sem erva-mate) foi avaliado utilizando o índice de bioacessibilidade (IB) calculado pela Eq. (1) (ORTEGA *et al.*, 2011).

$$\text{Eq. (1)} \quad IB (\%) = 100 * \frac{A}{B}$$

Onde A é a concentração de cada composto fenólico individual no final da fase intestinal e B é a concentração de cada composto fenólico na amostra controle (digerida, mas sem ação de enzimas e sais biliares).

2.5 Atividade antioxidante dos pães durante a digestão *in vitro*

A atividade antioxidante *in vitro* das amostras de pães digeridas e controles (sem ação de enzimas e sais biliares) foram analisadas. A atividade do radical ABTS foi determinado de acordo com Re *et al.* (1999), e a atividade do radical DPPH foi determinado utilizando a metodologia de Brand-Willians *et al.* (1995). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol Trolox}$ equivalentes por g de amostra ($\mu\text{mol Trolox/g}$).

2.6 Análises LC-MS/MS de compostos fenólicos individuais de amostras de pães digeridas e controles

Os compostos fenólicos individuais dos pães foram analisados nas amostras após a digestão simulada *in vitro* e nas amostras controles (sem ação de enzimas e sais biliares). Os extratos foram obtidos conforme descrito no item 2.4. A análise quantitativa foi realizada de acordo com o procedimento analítico descrito por Seraglio *et al.* (2016). A análise de cromatografia líquida de ionização por eletrospray - espectrometria de massa em tandem (LC-ESI-MS/MS) foi realizada em um sistema cromatográfico Agilent série 1290 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa de armadilha de íons linear quadruplo híbrido QTRAP 5500 (Sciex, Foster City, CA) equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI). Os parâmetros cromatográficos e de espectrometria de massa foram utilizados conforme descrito por

Santetti *et al.* (2021b). A Tabela 2 (APÊNDICE D) apresenta os parâmetros específicos do analito otimizados através da injeção direta de soluções padrão para cada composto. O software Analyst 1.6.2 (Sciex, Foster City, CA) foi utilizado para aquisição e processamento dos dados. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/g}$ de amostra úmida.

2.7 Análise estatística

Os resultados foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA), com 95% de intervalo de confiança e as médias foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o software SASM-Agri versão 8.2. A análise de componentes principais (ACP) foi realizada utilizando o software STATISTIC versão 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da digestão *in vitro* na atividade antioxidante de pães

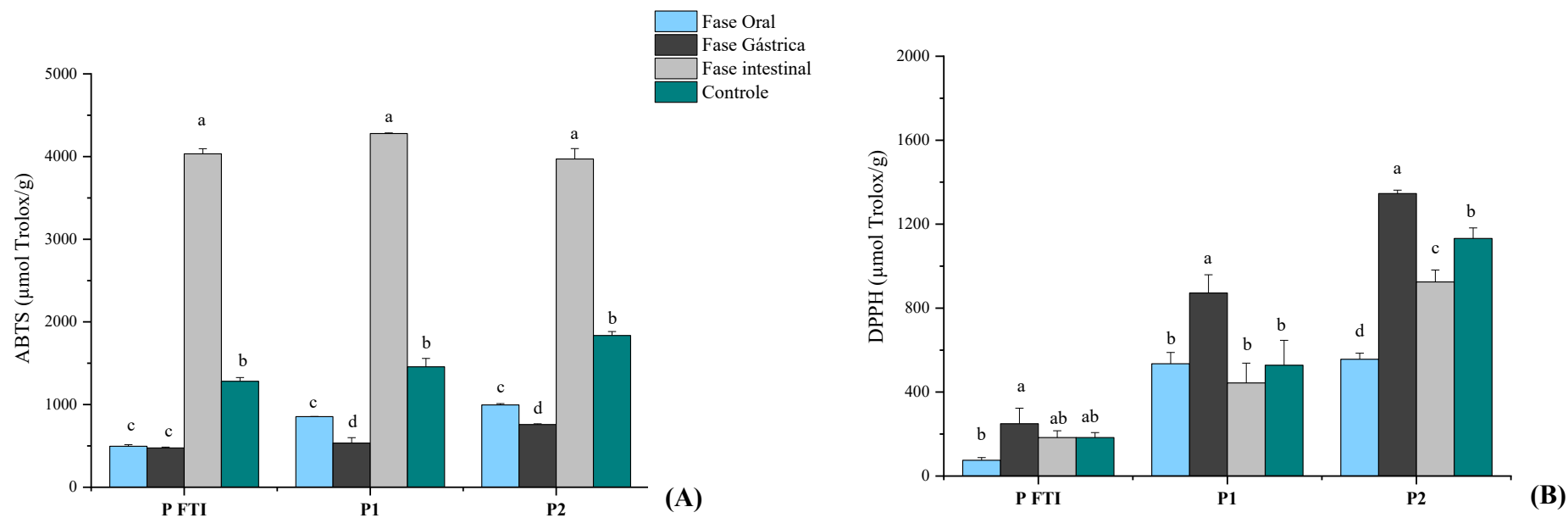
A Figura 2 apresenta os resultados para a atividade antioxidante das amostras de pães digeridas e controles. A capacidade antioxidante avaliada pelos métodos de ABTS e DPPH das amostras de pães digeridas e controle apresentaram comportamentos distintos para cada método. A maior atividade antioxidante pelo ensaio de ABTS foi observada durante a digestão na fase intestinal, enquanto no ensaio DPPH a fase gástrica apresentou os maiores valores de atividade ($p < 0,05$) para as três amostras P FTI, P1 e P2 (Figura 2B e 2C, respectivamente). No ensaio ABTS, a atividade antioxidante encontrada na fase intestinal representou 80% para P FTI, 75% para B1 e 69% para B2, do total quantificado nos estágios da digestão. O aumento observado na atividade antioxidante sob as condições intestinais tem sido atribuído à desprotonação das porções hidroxila presentes nos anéis aromáticos dos compostos fenólicos (CÖMERT; GÖKMEN, 2022). Por outro lado, no ensaio de DPPH a fase gástrica representou 49% para P FTI, 47% para P1 e 47% para P2, do total da atividade antioxidante comparado as outras fases da digestão.

A partir da fase gástrica, tanto para CFT quanto para a atividade antioxidante pelo ensaio de ABTS, os valores aumentaram gradualmente em comparação a fase oral.

Bączek *et al.* (2020) observaram que a atividade antioxidante dos pães de aveia aumentou consideravelmente após o processo digestivo quando comparada às amostras controle. Esse aumento pode ser explicado pela ação das enzimas digestivas que permitiram liberar componentes com atividade antioxidante da matriz (pão). Em contrapartida, o processo de digestão pode afetar a atividade antioxidante devido à redução na concentração do composto e/ou transformação em diferentes formas estruturais. Ainda, as alterações do pH durante o processo digestivo podem afetar a racemização de moléculas, possivelmente criando dois enantiômeros quirais com reatividade diferente do composto original, alterando, assim suas atividades biológicas (BLANCO CANALIS *et al.*, 2020).

Os resultados indicam que o processo digestivo *in vitro* liberou efetivamente os compostos fenólicos da matriz alimentar, muito provavelmente pelas diferentes ações das enzimas (α -amilase, pepsina, pancreatina) e as alterações do pH do meio. Podio *et al.* (2019) afirmaram que as condições utilizadas na fase gástrica, por exemplo, poderiam promover a quebra de ligações covalentes entre os compostos fenólicos e as proteínas da matriz alimentar, aumentando, assim, o teor de fenólicos na amostra, e conseqüentemente a atividade antioxidante.

Figura 2. Alteração da atividade antioxidante *in vitro* (A e B) das amostras de pão durante a digestão simulada *in vitro* e das amostras controle



Cada valor é apresentado como média \pm desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) das amostras para cada fase da digestão, pelo teste de Tukey. P FTI: Pão integral; P1: Pão com 2,5% EM (g EM/100 g FTI); P2: Pão com 4,5% EM (g EM/100 g FTI); EM: Erva-mate; FTI: Farinha de trigo integral.

3.2 Mudanças nas concentrações de compostos fenólicos individuais durante a digestão *in vitro* de pães

O perfil fenólico das amostras de pães durante a digestão *in vitro* e amostras controle estão apresentadas na Tabela 1. Diversas classes de compostos fenólicos foram identificadas nas amostras de pães digeridas e controle, dentre elas os ácidos fenólicos e flavonoides. Um total de 19 compostos fenólicos foram identificados nas amostras de pães durante as três fases da digestão (oral, gástrica e intestinal), além da amostra controle.

A concentração de compostos fenólicos foi maior nas amostras digeridas comparadas às amostras controle. Para a amostra PFTI, na fase oral houve maiores concentrações de fenólicos ($p < 0,05$), seguida da fase gástrica. Ácido ferúlico, 2,5-DHBA, ácido sináptico e ácido benzoico foram os compostos fenólicos presentes em maiores concentrações para as três fases da digestão (oral, gástrica e intestinal) nesta amostra, com destaque para o ácido ferúlico, que foi o composto majoritário (6960,76 $\mu\text{g/g}$ – fase oral; 899,54 $\mu\text{g/g}$ - fase intestinal; 538,46 $\mu\text{g/g}$ - fase gástrica) nas três fases da digestão, representando 50% do total de compostos fenólicos identificados. O fato do ácido ferúlico apresentar liberação completa já na primeira etapa da digestão pode ser explicado pela alta solubilidade do composto em água (ALMEIDA *et al.*, 2020). Além disso, é considerado o composto majoritário em trigo (SANTOS *et al.*, 2019), justificando a sua elevada concentração nas amostras de pães sem a adição de erva-mate.

Na amostra de pão P1, observou-se que a fase gástrica apresentou as maiores concentrações de compostos fenólicos ($p < 0,05$), seguida da fase oral. O ácido clorogênico e a rutina foram os compostos com maiores concentrações nas três fases, representando 51% e 21%, do total, respectivamente. A amostra de pão P2 seguiu o mesmo comportamento, com maior concentração ($p < 0,05$) de compostos fenólicos (ácido clorogênico, rutina, 2,4-DHBA, ácido ferúlico e ácido cafeico) na fase gástrica, seguida da fase oral. Além disso, o ácido clorogênico e a rutina também foram os principais compostos identificados na amostra P2 na fase gástrica, representando 59 e 21% do total de polifenóis, respectivamente. Estes polifenóis são considerados majoritários da erva-mate (SANTETTI *et al.*, 2021b), podendo justificar a sua bioacessibilidade após a digestão. É conhecido que uma das importantes ações biológicas do ácido clorogênico e cafeico é a ação antioxidante, inibindo o processo de oxidação das células, e podem apresentar ação antidiabética, atuando na inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase

(KUMAR; GOEL, 2019). Já a rutina apresenta ação antiobesidade, reduzindo os níveis de gordura no sangue (RIACHI; DE MARIA, 2017). Outros compostos também foram identificados com elevada concentração nos pães P1 e P2, sendo eles ácido cafeico, 2,5-DHBA e 2,4-DHBA.

Tabela 1. Composição fenólica individual dos pães durante a simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*.

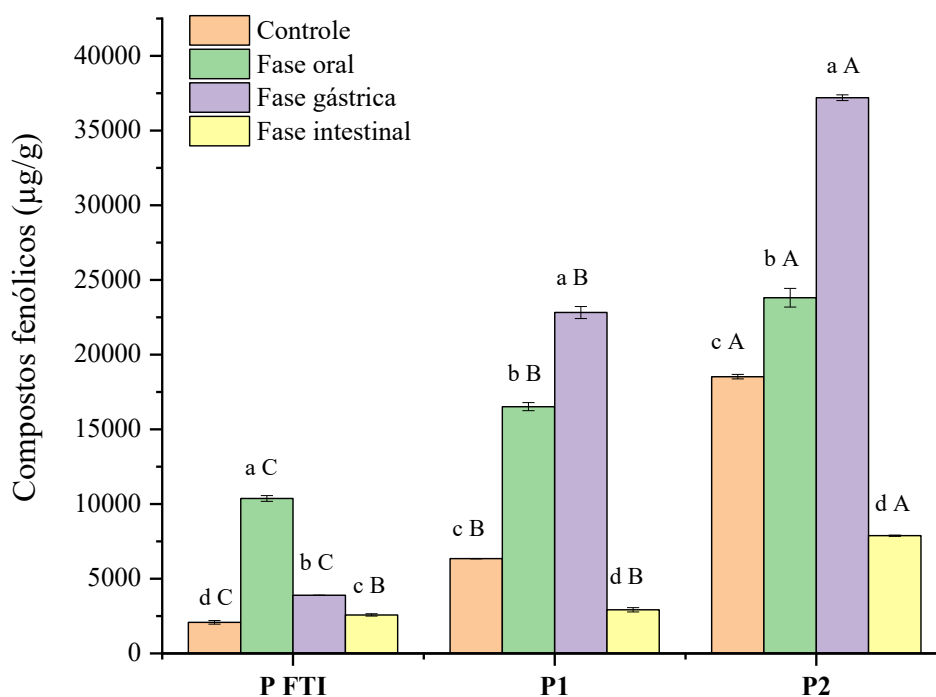
Compostos fenólicos (µg/g)	P FTI				P1				P2			
	Controle	Fase oral	Fase gástrica	Fase intestinal	Controle	Fase oral	Fase gástrica	Fase intestinal	Controle	Fase oral	Fase gástrica	Fase intestinal
Ácidos fenólicos												
Ácido benzoico	138,00 ^b ± 0,71	232,52 ^a ± 2,81	122,18 ^b ± 2,21	107,62 ^b ± 5,95	140,30 ^b ± 4,29	268,40 ^a ± 9,82	168,42 ^{ab} ± 13,95	158,44 ^{ab} ± 0,99	131,00 ^a ± 3,71	145,10 ^a ± 0,46	121,66 ^a ± 0,35	176,78 ^a ± 9,26
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	173,24 ^a ± 0,98	110,56 ^a ± 19,63	167,56 ^a ± 0,74	169,04 ^a ± 1,47	161,06 ^a ± 0,02	165,04 ^a ± 0,96	171,78 ^a ± 1,15	166,50 ^a ± 1,44	n.d	164,44 ^a ± 0,62	171,68 ^a ± 1,43	166,24 ^a ± 1,58
Ácido ferúlico	332,76 ^c ± 24,52	6960,76 ^a ± 39,36	538,46 ^{bc} ± 9,57	899,54 ^b ± 0,47	<LOQ	358,76 ^b ± 21,38	772,96 ^a ± 1,61	105,12 ^c ± 0,71	<LOQ	1910,64 ^a ± 2,56	808,20 ^b ± 2,11	117,08 ^c ± 0,35
Ácido siringico	170,76 ^a ± 0,71	152,84 ^a ± 8,80	125,82 ^a ± 0,71	155,56 ^a ± 1,07	127,10 ^a ± 0,39	128,36 ^a ± 0,70	129,62 ^a ± 0,81	128,84 ^a ± 0,44	129,22 ^b ± 0,46	124,70 ^b ± 1,35	128,98 ^b ± 0,43	156,36 ^a ± 0,66
Ácido clorogênico	<LOQ	59,28 ^b ± 2,74	113,06 ^a ± 7,80	<LOQ	4201,30 ^b ± 22,00	4593,80 ^b ± 23,69	14945,70 ^a ± 66,50	932,50 ^c ± 1,41	15714,30 ^b ± 13,88	5924,26 ^c ± 0,71	24913,72 ^a ± 70,99	5205,50 ^d ± 48,68
2,5-DHBA	512,10 ^a ± 19,57	479,80 ^a ± 15,88	339,98 ^a ± 0,78	332,88 ^a ± 0,76	513,70 ^{ab} ± 20,88	993,80 ^a ± 39,39	352,28 ^b ± 0,64	280,30 ^b ± 23,77	509,88 ^b ± 24,45	838,74 ^a ± 12,59	375,34 ^c ± 5,25	519,04 ^b ± 26,50
2,4-DHBA	218,84 ^b ± 0,71	212,68 ^b ± 4,24	1422,20 ^a ± 7,06	n.d	245,34 ^b ± 0,63	502,68 ^a ± 3,64	280,22 ^b ± 0,66	n.d	323,94 ^b ± 0,94	1360,60 ^a ± 28,84	164,72 ^c ± 0,71	188,04 ^c ± 0,64
Ácido salicílico	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
3,4-DHB	n.d	277,44 ^a ± 1,05	219,8 ^b ± 0,71	195,5 ^c ± 0,97	259,72 ^b ± 0,92	530,12 ^a ± 0,73	220,54 ^c ± 0,78	207,72 ^c ± 0,71	325,24 ^b ± 0,49	493,48 ^a ± 0,68	225,02 ^d ± 0,57	263,56 ^c ± 1,07
Ácido <i>p</i> -Cumárico	<LOQ	131,26 ^a ± 0,69	109,72 ^b ± 0,64	140,56 ^a ± 0,78	128,56 ^c ± 1,57	270,56 ^a ± 1,42	106,16 ^d ± 1,22	157,30 ^b ± 0,52	123,30 ^{bc} ± 0,37	331,62 ^a ± 6,98	108,58 ^c ± 1,65	169,66 ^b ± 0,71
Ácido vanílico	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Ácido gálico	<0	101,58 ^a ± 17,67	158,26 ^a ± 0,74	152,6 ^a ± 0,66	n.d	141,80 ^a ± 1,90	145,88 ^a ± 2,70	n.d	143,10 ^a ± 3,13	152,98 ^a ± 0,43	145,62 ^a ± 2,84	142,28 ^a ± 3,38
Ácido cafeico	153,68 ^a ± 0,83	169,40 ^a ± 0,64	121,24 ^a ± 11,24	112,78 ^a ± 13,15	n.d	921,08 ^a ± 13,80	347,84 ^b ± 18,22	n.d	n.d	1172,54 ^a ± 3,22	492,60 ^b ± 3,58	152,88 ^c ± 1,06
3,5-DNB cloreto ácido	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ácido Sináptico	207,30 ^b ± 16,28	328,22 ^a ± 0,71	179,64 ^b ± 1,00	n.d	n.d	<LOQ	169,74 ^a ± 0,76	n.d	n.d	163,32 ^b ± 0,71	214,44 ^a ± 15,37	n.d
<i>Somatório dos ácidos fenólicos (µg/g)</i>	<i>1906,68</i>	<i>9216,34</i>	<i>3618,92</i>	<i>2266,08</i>	<i>5777,08</i>	<i>8874,4</i>	<i>17811,14</i>	<i>2136,72</i>	<i>17399,98</i>	<i>12782,42</i>	<i>27870,56</i>	<i>2103,97</i>
Flavonoides												
Pinocebrim	<LOQ	n.d	<LOQ	<LOQ	n.d	<LOQ	n.d	n.d	<LOQ	<LOQ	n.d	<LOQ
Galangina	<LOQ	n.d	<LOQ	n.d	<LOQ	<LOQ	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d
Apigenina	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	<LOQ	n.d	<LOQ
Kaempferol	<LOQ	n.d	<LOQ	n.d	n.d	104,72 ^a ± 3,90	134,52 ^a ± 7,57	n.d	n.d	n.d	109,78 ^a ± 2,64	<LOQ
Epicatequina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d	<LOQ	<LOQ

Catequina	n.d	136,64 ^a ± 1,41	n.d	<LOQ	138,02 ^a ± 0,71	140,16 ^a ± 3,20	n.d	141,40 ^a ± 0,42	n.d	141,62 ^a ± 0,59	n.d	n.d
Hesperidina	<LOQ	<LOQ	n.d	<LOQ	<LOQ	253,20 ^a ± 2,35	216,96 ^b ± 0,72	162,34 ^c ± 0,11	334,00 ^b ± 4,03	364,92 ^b ± 0,95	738,98 ^a ± 5,93	<LOQ
Luteolina	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Crisina	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Naringenina	<LOQ	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	<LOQ	n.d
Pinobanksina	<LOQ	<LOQ	n.d	<LOQ	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	<LOQ	<LOQ	n.d
Quercetina	126,20 ^a ± 7,68	102,48 ^a ± 0,71	116,02 ^a ± 4,16	<LOQ	n.d	147,60 ^a ± 2,19	120,56 ^b ± 0,72	n.d	n.d	114,16 ^a ± 3,45	129,62 ^a ± 0,76	<0
Isorahmenetina	<LOQ	n.d	<LOQ	<LOQ	n.d	<LOQ	<LOQ	n.d	n.d	<LOQ	<LOQ	n.d
Isoquercetrina	n.d	175,32 ^a ± 2,08	93,78 ^b ± 0,70	n.d	n.d	260,84 ^a ± 0,69	162,46 ^b ± 4,31	n.d	n.d	263,98 ^a ± 1,18	214,92 ^b ± 2,73	n.d
Naringina	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	202,52 ^a ± 6,68	n.d
Rutina	n.d	371,22 ^a ± 3,54	n.d	n.d	365,10 ^c ± 0,60	6168,76 ^a ± 122,64	4105,12 ^b ± 4,85	421,60 ^c ± 6,29	506,58 ^c ± 4,07	9842,90 ^a ± 146,79	7881,12 ^b ± 13,75	548,46 ^c ± 2,11
<i>Somatório dos flavonoides</i> (µg/g)	126,20	785,66	209,80	-	503,12	7075,28	4739,62	725,34	840,58	10727,58	9276,94	548,46
Lignanans												
Siringaldeido	48,6 ^b ± 8,19	142,36 ^a ± 4,41	62,5 ^b ± 0,06	98,50 ^{ab} ± 0,78	65,18 ^b ± 3,88	150,52 ^a ± 5,67	55,34 ^b ± 3,78	58,48 ^b ± 9,28	69,78 ^a ± 0,64	79,46 ^a ± 7,94	53,44 ^b ± 4,68	73,48 ^a ± 2,56
Sinapaldeido	n.d	229,74 ^a ± 1,36	n.d	212,8 ^a ± 3,56	n.d	225,72 ^a ± 2,50	217,34 ^a ± 2,03	n.d	217,20 ^a ± 2,21	218,52 ^a ± 2,59	n.d	n.d
<i>Somatório das lignanans</i> (µg/g)	48,60	372,10	62,50	311,30	65,18	376,24	272,68	58,48	286,98	297,98	53,44	73,48

Cada resultado é apresentado como média ± desvio padrão (n=2). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05) entre as fases da digestão para cada amostra, pelo teste de Tukey. P FTI: Pão integral; P1: Pão com 2,5% EM (g EM/100 g FTI); P2: Pão com 4,5% EM (g EM/100 g FTI); EM: Erva-mate; FTI: Farinha de trigo integral; < LOQ: limite inferior de quantificação (50 µg/mL); n.d: não detectado.

Estes resultados podem ser verificados na Figura 3, que ilustra a soma dos compostos individuais após o processo de digestão *in vitro* dos pães. O P FTI apresentou maior concentração de fenólicos na fase oral, enquanto o P1 e P2 apresentaram na fase gástrica ($p < 0,05$). Quando comparado os valores de compostos fenólicos entre as amostras, a amostra P2, com a maior proporção de erva-mate (4,5%), apresentou os maiores valores nas três fases avaliadas.

Figura 3. Soma de compostos fenólicos individuais de pães durante a digestão gastrointestinal *in vitro* e amostras controle.



Cada valor é apresentado como média \pm desvio padrão ($n=2$). Letras minúsculas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre as amostras, e letras maiúsculas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) para cada etapa da digestão e para cada amostra, pelo teste de Tukey. P FTI: Pão integral; P1: Pão com 2,5% EM (g EM/100 g FTI); P2: Pão com 4,5% EM (g EM/100 g FTI); EM: Erva-mate; FTI: Farinha de trigo integral;

Estudos relatam que os compostos fenólicos são mais estáveis em pH ácido, explicando o aumento da bioacessibilidade na fase gástrica (HAAS *et al.*, 2019; KETNAWA *et al.*, 2021). De fato, a maioria dos compostos sofreram uma redução significativa ($p < 0,05$) em sua concentração na fase intestinal, o que pode ser explicado pela alcalinidade do meio em que foram submetidos, bem como pela ação de enzimas pancreáticas que possivelmente alteraram a estrutura química destes compostos, afetando sua solubilidade (RIBEIRO *et al.*, 2019). Além disso, a redução ou não detecção destes

compostos ao longo da digestão, pode ser explicada pelo fato dos ácidos fenólicos serem mais sensíveis a alterações de pH ou ação enzimática (BLANCO CANALIS *et al.*, 2020), justificando os resultados apresentados neste estudo.

Para avaliar a estabilidade e as mudanças no perfil de compostos fenólicos das amostras de pães durante a simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*, o índice de bioacessibilidade foi calculado após a digestão completa e os resultados estão apresentados na Tabela 2. Os índices de bioacessibilidade dos compostos fenólicos das amostras de pães apresentaram variabilidade, podendo ser justificada pela matriz que pode alterar a sua estabilidade e o comportamento dos compostos durante o processo digestivo. Observou-se que alguns compostos fenólicos apresentaram alta bioacessibilidade na amostra P FTI, sendo que a mesma tendência foi observada nos pães adicionados de erva-mate, P1 e P2. Contudo, o ácido ferúlico e ácido cafeico apresentaram altos índices de bioacessibilidade (270% e 79%, respectivamente) somente para a amostra P FTI. Para as amostras P1 e P2, os maiores índices de bioacessibilidade foram observados para o ácido benzoico, siringaldeido, ácido siringico, 2,5-DHBA, ácido *p*-cumárico e rutina (bioacessibilidade maior que 100%). Tais compostos apresentam atividades biológicas importantes para o organismo, como o ácido siringico, por exemplo, que é conhecido por atuar como antidiabético e o ácido *p*-cumárico, que atua na prevenção de câncer e doenças cardiovasculares. Já o ácido 2,5-hidroxibenzoico apresenta ação antioxidante e também atua na inibição da peroxidação lipídica (RASHMI; NEGI, 2020). Ainda, a rutina atua na redução do risco de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (RIACHI; DE MARIA, 2017). De fato, isso evidencia que cada composto pode atuar de diferentes formas, e até mesmo em sinergia quando ingeridos e absorvidos pelo organismo.

Tabela 2. Índice de bioacessibilidade de compostos fenólicos após o processo de digestão *in vitro* dos pães.

Compostos fenólicos	Índice de Bioacessibilidade (%)		
	P FTI	P1	P2
Ácido benzoico	77,99	112,93	134,95
Ácido <i>p</i> -Aminobenzoico	97,58	103,38	<i>nd</i>
Siringaldeido	202,67	89,72	105,30
Ácido ferúlico	270,33	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Ácido siríngico	91,10	101,37	121,00
Catequina	<i>nd</i>	102,45	<i>nd</i>
Ácido clorogênico	<i>nd</i>	22,20	33,13
2,5-DHBA	65,00	54,56	101,80
2,4-DHBA	<i>nd</i>	<i>nd</i>	58,05
3,4-DHB	<i>nd</i>	79,98	81,04
Ácido <i>p</i> -Cumárico	<i>nd</i>	122,36	137,60
Ácido gálico	<i>nd</i>	<i>nd</i>	99,43
Ácido cafeico	79,39	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Rutina	<i>nd</i>	115,48	108,27

P FTI: Pão integral; P1: Pão com 2,5% EM (g EM/100 g FTI); P2: Pão com 4,5% EM (g EM/100 g FTI); EM: Erva-mate; FTI: Farinha de trigo integral; *nd*: não detectado. 3,4-DHB: Ácido 3,4-Diidroxibenzoico. 2,5-DHBA: Ácido 2,5-Diidroxibenzoico. 2,4-DHBA: Ácido 2,4-Diidroxibenzoico.

Vale salientar que a maioria dos polifenóis são propensos a degradação em condições alcalinas; portanto, esses compostos podem ser facilmente transformados em outras formas estruturais desconhecidas e/ou não detectadas, uma vez que o método analítico utilizado é baseado em razões de massa/carga (*m/z*). Sendo assim, modificações estruturais com alteração de massa, mesmo que pequenas, podem gerar resultados não detectáveis do composto original. Esses fatores podem levar a resultados com grande diversidade de valores de bioacessibilidade e atividades biológicas (YAGCI *et al.*, 2022), como observado para o composto clorogênico nas amostras P1 e P2, que apesar de ser encontrado em altas concentrações nas três fases da digestão, apresentou valores baixos de bioacessibilidade (22 e 33% para P1 e P2, respectivamente) quando comparado com outros compostos com altos índices (acima de 100%). Uma explicação para este comportamento é que alguns compostos fenólicos podem se ligar a outras biomoléculas

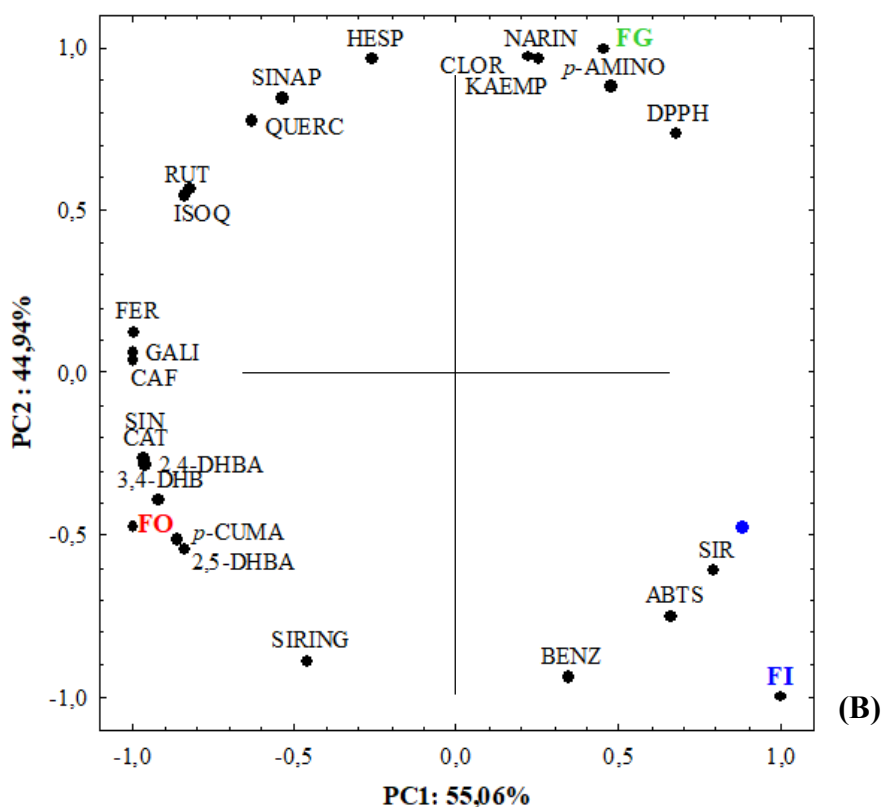
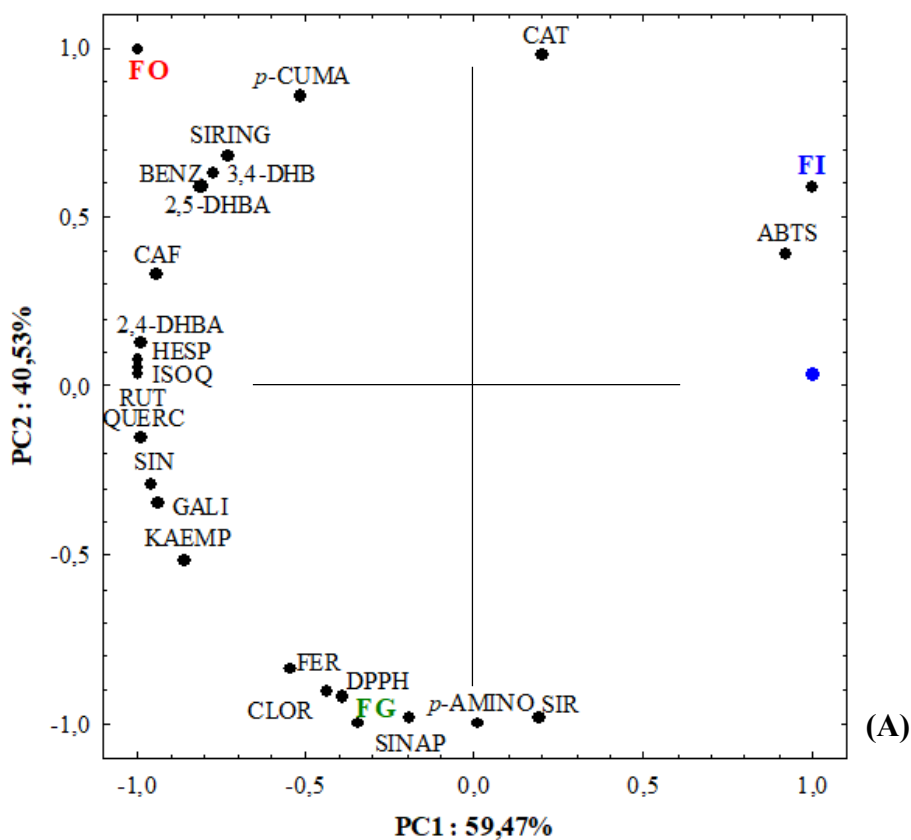
nos fluidos da digestão (SEŃCZYK *et al.*, 2021), e, conseqüentemente, reduzir sua suscetibilidade à absorção no organismo.

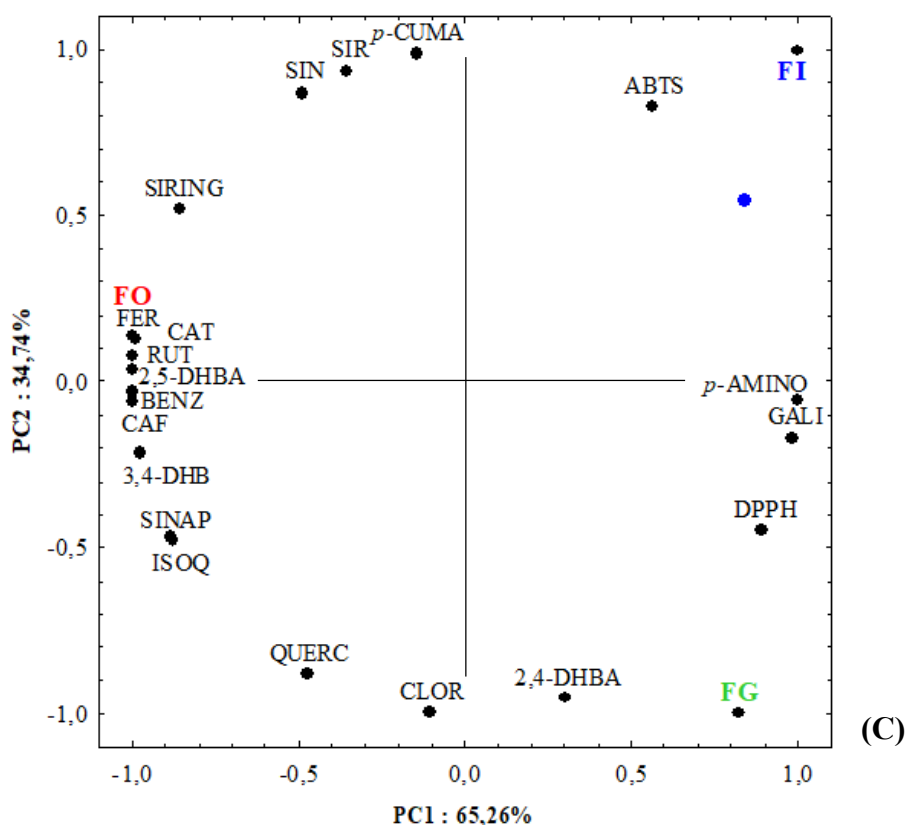
Neste estudo, embora os pães tenham apresentado variações no perfil fenólico e na bioacessibilidade destes compostos, sugere-se que a adição de erva-mate no pão integral contribui para o aumento da funcionalidade do pão, além de possibilitar a inclusão de um antioxidante natural que possui elevadas concentrações de compostos fenólicos.

3.3 Análise de Componentes Principais (ACP)

Para compreender o conjunto de dados, a inter-relação e as diferenças no perfil fenólico, teor de polifenóis totais e atividade antioxidante das amostras de pães com erva-mate e amostra controle após a simulação gastrointestinal *in vitro*, a análise de componentes principais (ACP) foi aplicada aos dados (Figura 4).

Figura 4. Análise de componentes principais dos compostos fenólicos individuais e atividade antioxidante durante as etapas de digestão *in vitro* de pães (A) P1, (B) P2 e (C) P FTI.





P FTI: Pão integral; P1: Pão com 2,5% EM (g EM/100 g FTI); P2: Pão com 4,5% EM (g EM/100 g FTI); EM: Erva-mate; FTI: Farinha de trigo integral. FO: fase oral; FG: fase gástrica; FI: fase intestinal. *p*-CUMA: *p*-cumárico. CAT: catequina. SIRING: siringaldeído. CAF: cafeico. GALI: gálico. BENZ: benzoico. 3,4-DHB: 3,4-Diidroxibenzoico. 2,5-DHBA: 2,5-Diidroxibenzoico. 2,4-DHBA: 2,4-Diidroxibenzoico. SIR: siringico. QUERC: quercetina. KAEMP: kaempferol. FER: ferulico. CLOR: clorogênico. *p*-AMINO: *p*-aminobenzoico. RUT: rutina. HESP: hesperidina. SIN: sinapaldeído. SINAP: sináptico. ISOQ: isoquercetina. NARIN: naringina. ABTS e DPPH: atividade antioxidante usando métodos de sequestro de radicais livres

Houve uma clara separação entre as três fases da digestão *in vitro* (oral, gástrica e intestinal) para as três amostras de pães estudadas. Os dois componentes principais (PC1 e PC2) explicaram 100% da variância total dos dados após a digestão das amostras de pães com e sem erva-mate (Figura 4). Para a amostra P1 (2,5% EM) (Fig 4A), o PC1 explicou a maior parte da variabilidade dos dados 59,47%, enquanto o PC2 explicou 40,53% da dispersão total (Figura 4A). A análise multivariada revelou que a amostra P1 apresentou forte associação com a maioria dos compostos fenólicos individuais na fase oral e gástrica em PC1. O ácido ferúlico, ácido clorogênico, ácido gálico e quercetina e a capacidade antioxidante (método DPPH) apresentaram forte associação com a fase gástrica, já a fase intestinal apresentou forte associação o composto catequina e atividade antioxidante (método ABTS). Já para a amostra P2 (4,5% EM), o PC1 explicou 55,06% da variabilidade dos dados, enquanto o PC2 explicou 44,94% da dispersão total dos dados

(Figura 4B). A maioria dos compostos fenólicos individuais da amostra P2 foram separados na fase oral. A hesperidina, ácido sináptico, naringina, ácido *p*-aminobenzoico, quercetina, ácido clorogênico, campferol e atividade antioxidante (método DPPH) apresentaram forte associação com a fase gástrica. Já a fase intestinal apresentou forte associação com os ácidos siríngico e benzoico, e atividade antioxidante (método ABTS). Para a amostra controle (P FTI), o PC1 explicou 65,26% da variabilidade dos dados, enquanto o PC2 explicou 34,74% da dispersão total (Figura 4C). Observou-se que a maioria dos compostos fenólicos foram separados na fase oral. As fases gástrica e intestinal apresentaram forte associação com a atividade antioxidante (métodos ABTS e DPPH), e com os compostos ácido gálico, 2,4-DHBA, ácido *p*-aminobenzoico e ácido clorogênico.

A análise multivariada revelou que houve modificações na composição fenólica dos pães elaborados com erva-mate nas diferentes fases da digestão simulada *in vitro*. Verificou-se que a maioria dos compostos fenólicos apresentaram forte associação com a fase oral e gástrica, e uma porção pequena na fase intestinal; e, de acordo com a literatura, é na fase intestinal que o composto de interesse está disponível para ser absorvido pelo organismo (KETNAWA *et al.*, 2021). Ainda que, a maioria dos compostos tenham permanecido na fase oral e na fase gástrica, a fase intestinal apresentou forte associação com compostos fenólicos importantes, que poderão exercer benefícios ao organismo quando consumidos.

4. CONCLUSÕES

Este trabalho é pioneiro na investigação da bioacessibilidade dos compostos fenólicos de pães integrais elaborados com erva-mate durante a digestão simulada *in vitro*. Os pães apresentaram compostos fenólicos potencialmente bioacessíveis, como o ácido benzoico, ácido siríngico, siringaldeído, rutina e ácido *p*-cumárico em altas concentrações. Elevadas concentrações de compostos fenólicos bioacessíveis foram encontradas nas diferentes fases da digestão, especialmente na fase gástrica, como o ácido ferúlico para a amostra P FTI, e rutina, ácido clorogênico e *p*-cumárico para as amostras P1 e P2. Contudo, observou-se que a maioria dos compostos fenólicos tiveram suas concentrações reduzidas ao final da digestão (fase intestinal). A análise multivariada indicou que os compostos fenólicos dos pães foram influenciados pelo processo digestivo,

e houve uma clara separação entre as fases de digestão (oral, gástrica e intestinal), considerando sua composição fenólica e atividade antioxidante.

Diante do exposto, a adição de erva-mate no pão integral contribuiu para o aumento da bioatividade do pão, o que foi comprovado pelo perfil fenólico e atividade antioxidante do produto; além disso, demonstrou ser uma estratégia viável de incorporação de um antioxidante natural e com importância regional.

REFERÊNCIAS

- AACCI. American Association of Cereal Chemists International. **Approved Methods of Analysis** (11 th ed.). St Paul, MN, USA: AACC International, 2010.
- AYLANC, V. *et al.* Assessment of Bioactive Compounds under Simulated Gastrointestinal Digestion Bee Pollen and Bee Bread: Bioaccessibility and Antioxidant Activity. **Trends in Food Science & Technology**, v.109, p.465-481, 2021.
- ALMEIDA, S.S. *et al.* Bioaccessibility and gut metabolism of phenolic compounds of breads added with green coffee infusion and enzymatically bioprocessed. **Food Chemistry**, v.333, p.127473, 2020.
- BĄCZEK, N. *et al.* Assessment of the glycaemic index, content of bioactive compounds, and their *in vitro* bioaccessibility in oat-buckwheat breads. **Food Chemistry**, v.330, p.127199, 2020.
- BLANCO CANALIS, M.S. *et al.* Effect of peach puree incorporation on cookie quality and on simulated digestion of polyphenols and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.333, p.127464, 2020.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, A.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.
- BRACESCO, N. *Ilex paraguariensis* as a healthy food supplement for the future world. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v.16, p.1-3, 2019.
- BRESSIANI, J. *et al.* Properties of whole grain wheat flour and performance in bakery products as a function of particle size. **Journal of Cereal Science**, v.75, p.269-277, 2017.
- CÖMERT, E. D.; GÖKMEN, V. Effect of food combinations and their co-digestion on total antioxidant capacity under simulated gastrointestinal conditions. **Current Research in Food Science**, v.5, p.414-422, 2022.
- CHEMINET, G.; BARONI, M.V.; WUNDERLIN, D.A. Antioxidant properties and phenolic composition of "Composed Yerba Mate". **Journal of Food Science and Technology**, v.58, p.4711–4721, 2021.
- FERRARIO, M. *et al.* Development and quality assessment of a turbid carrot-orange juice blend processed by UV-C light assisted by mild heat and addition of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) extract. **Food Chemistry**, v.269, p.567-576, 2018.
- HAAS, I.C.S. *et al.* Polyphenolic profile, macro- and microelements in bioaccessible fractions of grape juice sediment using *in vitro* gastrointestinal simulation. **Food Bioscience**, v.27, p.66-74, 2019.

- KETNAWA, S. *et al.* Changes in bioactive compounds and antioxidant activity of plant-based foods by gastrointestinal digestion: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2021.
- KUMAR, N.; GOEL, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, v.24, p.00370, 2019.
- LACHOWICZA, S.; ŚWIECA, M.; PEJ CZ, E. Biological activity, phytochemical parameters, and potential bioaccessibility of wheat bread enriched with powder and microcapsules made from Saskatoon berry. **Food Chemistry**, v.338, p.128026, 2021.
- MINEKUS, M. *et al.* A standardized static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, v.5, p.1113–1124, 2014.
- ORTEGA, N. *et al.* Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an *in-vitro* digestion model. **Food Chemistry**, v.124, p.65-71, 2011.
- SANTOS, M.C.B. *et al.* Metabolomic approach for characterization of phenolic compounds in different wheat genotypes during grain development. **Food Research International**, v.124, p.118-128, 2019.
- SARAIVA, B.R. *et al.* Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) addition on the functional and technological characteristics of fresh cheese. **Journal of Food Science and Technology**, v.56, p.1256-1265, 2019.
- SANTETTI, G. S *et al.* Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves on dough properties, antioxidant activity, and bread quality using whole wheat flour. **Journal of Food Science**, v.86, p.4354-4364, 2021a.
- SANTETTI, G.S. *et al.* The addition of yerba mate leaves on bread dough has influences on fermentation time and the availability of phenolic compounds? **LWT – Food Science and Technology**, v.146, p.111442, 2021b.
- SĘCZYK, Ł. *et al.* The effect of *in vitro* digestion, food matrix, and hydrothermal treatment on the potential bioaccessibility of selected phenolic compounds. **Food Chemistry**, v.344, p.128581, 2021.
- TIAN, W. *et al.* Changes in phenolic profiles and antioxidant activities during the whole wheat flour bread-making process. **Food Chemistry**, v.345, p.128851, 2021a.
- TIAN, W. *et al.* Potential bioaccessibility of phenolic acids in whole wheat products during *in vitro* gastrointestinal digestion and probiotic fermentation. **Food Chemistry**, v.362, p.130-135, 2021b.
- PETRILLI, A.A. *et al.* Effect of chocolate and yerba mate phenolic compounds on inflammatory and oxidative biomarkers in HIV/AIDS individuals. **Nutrients**, v.8, p.1-14, 2016.
- PODIO, N.S. *et al.* Assessment of bioactive compounds and their *in vitro* bioaccessibility in whole-wheat flour pasta. **Food Chemistry**, v.239, p.408-417, 2019.

- RASHMI, H.B.; NEGI, P.S. Phenolic acids from vegetables: A review on precessing stability and health benefits. **Food Research International**, v.136, p.109298, 2020.
- RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying in improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p.1231-1237, 1999.
- RIACHI, L.G.; de MARIA, A.B. Yerba mate: Na overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v.38, p.308-320, 2017.
- RIBEIRO, V.R. *et al.* Improvement of phenolic compound bioaccessibility from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts after biosorption on *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, v.126, p.108623, 2019.
- SERAGLIO, S.K.T. *et al.* Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach. **Food Research International**, v.87, p.60–67, 2016.
- VARGAS, B.K. *et al.* Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) microparticles modulate antioxidant markers in the plasma and brain of rats. **Food Bioscience**, v.41, p.100999, 2021.
- WANG, T.; HE, F.; CHEN, G. Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. **Journal of Functional Foods**, v.7, p.101-111, 2014.
- XU, J.; WANG, W.; LI, Y. Dough properties, bread quality, and associated interactions with added phenolic compounds: A review. **Journal of Functional Foods**, v.52, p.629-639, 2019.
- YAGCI, S. *et al.* Impact of tomato pomace powder added to extruded snack on the *in vitro* gastrointestinal behavior and stability of Bioactive compounds. **Food Chemistry**, v.368, p.130847, 2022.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo relatou pela primeira vez a elaboração de um pão com adição de erva-mate em farinha de trigo integral, avaliando a sua qualidade tecnológica, propriedades bioativas e bioacessibilidade de compostos fenólicos durante uma simulação gastrointestinal *in vitro*.

A revisão bibliográfica (capítulo 1) discorreu sobre a importância de utilizar um ingrediente funcional, com amplo reconhecimento regional como a erva-mate, para a elaboração de diferentes produtos alimentícios, em especial para a aplicação em produtos de panificação. Além disso, os desafios existentes para a elaboração de um pão com funcionalidade e qualidade eficazes são notáveis, e por isso se fez necessário o estudo dos principais fatores que contribuem para a elaboração de um pão com apelo funcional, utilizando um antioxidante natural rico em polifenóis, podendo garantir a qualidade tecnológica do produto final.

O capítulo 2 apresentou que os fatores de concentração de folhas e tamanho de partículas adicionadas na farinha de trigo integral podem determinar a qualidade do produto final. Concentrações de folhas de erva-mate inferiores a 5% foram suficientes para aumentar o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante dos pães, como também os tamanhos de partículas menores que 415 μm não afetaram a qualidade do pão. Ainda, neste estudo as concentrações de 2,5 e 4,5% apresentaram os melhores resultados em relação as propriedades de massa e panificação, bem como aumento no teor de polifenóis nos pães mesmo após o cozimento.

O capítulo 3 reportou que a fermentação do pão pode influenciar diretamente na presença ou ausência de compostos fenólicos no produto final. Além disso, o processo fermentativo teve influência na produção de CO_2 , devido provavelmente à interação de compostos fenólicos com a rede de glúten. Contudo, a adição de erva-mate favoreceu o aumento pronunciado do conteúdo fenólico e da atividade antioxidante da massa, além de demonstrar que os tempos de fermentação de 30 e 60 min foram os melhores para a maior liberação de compostos fenólicos na matriz, além de que a maior concentração de erva-mate (4,5%) favoreceu esse aumento.

O capítulo 4 demonstrou a diversidade de compostos fenólicos presentes nas farinhas, massas e pães elaborados pela incorporação de erva-mate na farinha de trigo integral. Além disso, foi possível avaliar as etapas do processamento do pão separadamente utilizando ferramentas metabolômicas robustas. As amostras de massa e

pão com a maior proporção de erva-mate (4,5%) apresentaram um perfil fenólico mais abundante quando comparado às farinhas, compreendendo que ações físicas e químicas durante o processo de panificação proporcionaram maior liberação dos compostos para a matriz. Ainda, as análises estatísticas multivariadas demonstraram que os principais compostos fenólicos se apresentaram na forma livre, possivelmente pela ação da temperatura de forno e pelo processo fermentativo, ocasionando a ruptura de ligações químicas entre os compostos e a matriz

O capítulo 5 reportou que os pães elaborados com a erva-mate apresentaram compostos potencialmente bioacessíveis, como o ácido benzoico, ácido siríngico, siringaldeído, rutina e ácido *p*-cumárico em altas concentrações. O processo digestivo apresentou comportamento distinto em relação ao perfil fenólico nos pães, sendo que a fase gástrica apresentou as maiores concentrações de compostos fenólicos. Por outro lado, ao final da digestão (fase intestinal) os compostos foram reduzidos significativamente, provavelmente devido a alcalinidade do meio em que foram submetidos, bem como pela ação de enzimas pancreáticas que possivelmente alteraram a estrutura química destes compostos, afetando sua solubilidade.

Diante do exposto, a adição de erva-mate no pão integral contribuiu para o aumento da bioatividade do pão, o que foi comprovado pelo perfil fenólico diversificado e atividade antioxidante do produto. Além disso, demonstrou ser uma estratégia viável de incorporação de um antioxidante natural e com grande importância regional. Ainda, este estudo apresentou inovação na área da panificação, possibilitando a diversificação de seus produtos e agregando valor nutricional e funcional a um alimento consumido mundialmente.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Material referente ao artigo do capítulo 2

Tabela 1. Análise estatística das propriedades de massa, panificação e compostos bioativos das farinhas e pães elaborados com diferentes proporções e tamanhos de partículas da erva-mate na farinha de trigo integral.

		<i>Fonte de variação</i>				
		<i>Tamanho de partícula (T.P)</i>	<i>Proporção de EM (PEM)</i>	<i>T.P x PEM</i>	<i>Total</i>	<i>C.V (%)</i>
GL		2	2	4	26	
AA		5,228*	14,24*	1,459*	26	0,3
E		0,055*	0,418*	0,032*	26	2,0
TDM		0,556*	0,245*	0,107*	26	1,29
ITM		79,675*	238,49*	7,922**	26	1,44
RE		436,271*	1107,818*	90,045*	26	3,06
EXT		111,625*	9,352**	27,363*	26	6,23
SV		0,52*	1,839*	0,443*	26	1,56
FIRM		3510,89*	19258,85*	8513,50*	26	2,81
MAST		13958,27*	23085,83*	9288,03*	26	10,78
CFT	Farinhas	1269,7*	3687,3*	444,8*	26	0,93
ABTS		26517,9*	3739153,5*	7777,6*	26	2,84
FRAP		12822,8*	544849*	6834,3*	26	5,1
DPPH		0,3028 *	0,0017*	0,0433*	26	3,44
CFT	Pães	43,416**	3993,216*	161,100*	26	2,87
ABTS		3477,336*	1631507,18*	48265,68*	26	1,92
FRAP		85,565 ^{ns}	248511,03*	4062,22*	26	2,38
DPPH		0,8357 *	0,0418*	0,5967*	26	1,43

GL: Graus de liberdade. AA: Absorção de água (%). E: Estabilidade (min). TDM: Tempo de desenvolvimento da massa (min). ITM: Índice de tolerância à mistura. RE: Resistência à extensão (g). EXT: Extensibilidade (mm). VE: Volume específico (cm³/g). FIRM: Firmeza (g). MAST: Mastigabilidade (g/sec). CFT: Conteúdo fenólico total. ABTS: Atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS⁺. FRAP: Poder antioxidante do redutor férrico. DPPH: Atividade de eliminação de radicais antioxidantes. * e **. Significativo ao nível de probabilidade de 0,01 e 0,05, respectivamente. ns: Não significativo.

Tabela 2. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das farinhas e pães elaborados com diferentes proporções e tamanhos de partículas da erva-mate na farinha de trigo integral.

Tamanho de partícula (µm)	Proporção EM (m/m)*			Proporção EM (m/m)*		
	1,5	2,5	4,5	1,5	2,5	4,5
Farinhas				Pães		
Compostos fenólicos totais (mg AGE/g)				Compostos fenólicos totais (mg AGE/g)		
EM Fina	98,75 ± 0,17 ^{cB}	109,23 ± 2,22 ^{bB}	139,03 ± 0,25 ^{aA}	75,45 ± 3,55 ^{cA}	91,84 ± 2,12 ^{bAB}	130,92 ± 2,93 ^{aA}
EM Média	106,08 ± 1,01 ^{cA}	114,64 ± 0,08 ^{bA}	130,47 ± 0,35 ^{aB}	83,48 ± 3,20 ^{cA}	89,3 ± 1,08 ^{bB}	116,3 ± 1,17 ^{aB}
EM Grossa	66,80 ± 1,20 ^{cC}	92,91 ± 0,34 ^{bC}	127,77 ± 1,04 ^{aC}	79,46 ± 3,61 ^{cA}	94,09 ± 2,07 ^{bA}	113,29 ± 2,81 ^{aB}
ABTS (µmol Trolox/g)				ABTS (µmol Trolox/g)		
EM Fina	930,38 ± 19,26 ^{cA}	1183,08 ± 21,93 ^{bAB}	2193,11 ± 94,48 ^{aA}	818,15 ± 32,11 ^{cB}	963,32 ± 11,88 ^{bB}	1824,63 ± 14,87 ^{aA}
EM Média	783,48 ± 11,19 ^{cC}	1198,54 ± 31,79 ^{bA}	2056,13 ± 31,45 ^{aAB}	799,36 ± 14,14 ^{cB}	1129,31 ± 22,92 ^{bA}	1534,1 ± 30,72 ^{aC}
EM Grossa	844,35 ± 10,03 ^{cB}	1135,25 ± 13,83 ^{bB}	2033,02 ± 22,16 ^{aB}	926,46 ± 3,50 ^{cA}	991,27 ± 8,75 ^{bB}	1635,04 ± 22,53 ^{aB}
FRAP (µmol Trolox/g)				FRAP (µmol Trolox/g)		
EM Fina	190,39 ± 1,13 ^{cB}	321,53 ± 4,81 ^{bA}	730,34 ± 12,29 ^{aA}	184,50 ± 3,55 ^{cA}	246,7 ± 4,78 ^{bC}	545,87 ± 9,66 ^{aA}
EM Média	200,01 ± 2,27 ^{cA}	309,1 ± 0,26 ^{bA}	701,93 ± 16,03 ^{aA}	185,56 ± 13,45 ^{cA}	311,78 ± 8,56 ^{bA}	466,33 ± 11,02 ^{aC}
EM Grossa	202,43 ± 2,04 ^{bA}	266,28 ± 52,27 ^{bA}	563,68 ± 9,18 ^{aB}	193,52 ± 4,34 ^{cA}	271,58 ± 7,90 ^{bB}	516,52 ± 6,25 ^{aB}
DPPH IC ₅₀ (µg/mL)				DPPH IC ₅₀ (µg/mL)		
EM Fina	0,32 ± 0,01 ^{aC}	0,29 ± 0,01 ^{bB}	0,20 ± 0,01 ^{cC}	1,26 ± 0,02 ^{bA}	1,30 ± 0,01 ^{aA}	0,48 ± 0,01 ^{cB}
EM Média	0,43 ± 0,01 ^{aB}	0,27 ± 0,04 ^{bB}	0,33 ± 0,01 ^{bB}	0,37 ± 0,01 ^{cC}	0,53 ± 0,01 ^{bB}	1,08 ± 0,04 ^{aA}
EM Grossa	0,46 ± 0,02 ^{cA}	0,72 ± 0,02 ^{aA}	0,67 ± 0,01 ^{bA}	0,68 ± 0,01 ^{aB}	0,21 ± 0,02 ^{cC}	0,33 ± 0,03 ^{bC}

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). * g EM/100 g FTI. Diferentes letras maiúsculas na mesma coluna e letras minúsculas na mesma linha, diferem estatisticamente (p<0,05) pelo teste de Tukey, para cada ensaio nas farinhas e pães. EM Fina: 245 µm. EM Média: 415,5 µm. EM Grossa: 623,9 µm. FTI: Farinha de trigo integral. ABTS: Atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS⁺. FRAP: Poder antioxidante do redutor férrico. DPPH: Atividade de eliminação de radicais antioxidantes.

APÊNDICE B - Material referente ao artigo do capítulo 3

Tabela 1. Composição química da farinha de trigo integral e das folhas de erva-mate.

Composição	FTI	FEM
Umidade (g/100 g)	14,33 ± 0,04	6,08 ± 0,02
Proteínas (g/100 g bs)	12,84 ± 0,11	15,04 ± 0,01
Lípidios (g/100 g bs)	1,52 ± 0,04	6,23 ± 0,06
Cinzas (g/100 g bs)	1,85 ± 0,04	5,29 ± 0,06
Fibra alimentar total (g/100 g)	13,58 ± 0,01	37,95 ± 2,62
Fibra solúvel (g/100 g)	2,00 ± 0,44	5,30 ± 0,14
Fibra insolúvel (g/100 g)	11,58 ± 0,34	32,65 ± 2,76
CFT (mg AGE/100 g)	82,95 ± 0,84	2256,7 ± 157,63
ABTS (µM/Trolox g)	443,80 ± 18,01	32254,7 ± 296,16
FRAP (µM/Trolox g)	95,84 ± 1,70	5814,45 ± 186,22

FEM: folhas de erva-mate (245 µm). FTI Farinha de trigo integral (controle). ABTS: Atividade antioxidante pela captura do radical livre ABTS^{•+}. FRAP: Poder antioxidante redutor férrico. CFT: Compostos fenólicos totais. bs: base seca.

Tabela 2. Propriedades de mistura da massa elaborada pela incorporação de erva-mate na farinha de trigo integral

Amostras	Absorção de água (%)	Estabilidade (min)
FTI	72,01 ± 0,02	9,10 ± 0,01
EM1	75,05 ± 0,05	3,11 ± 0,01
EM2	78,15 ± 0,05	3,11 ± 0,01

Cada valor é apresentado como média ± desvio padrão (n=3). FTI: farinha de trigo integral. EM1: 2,5 g EM/100 g FTI. EM2: 4,5 g EM/100 g FTI.

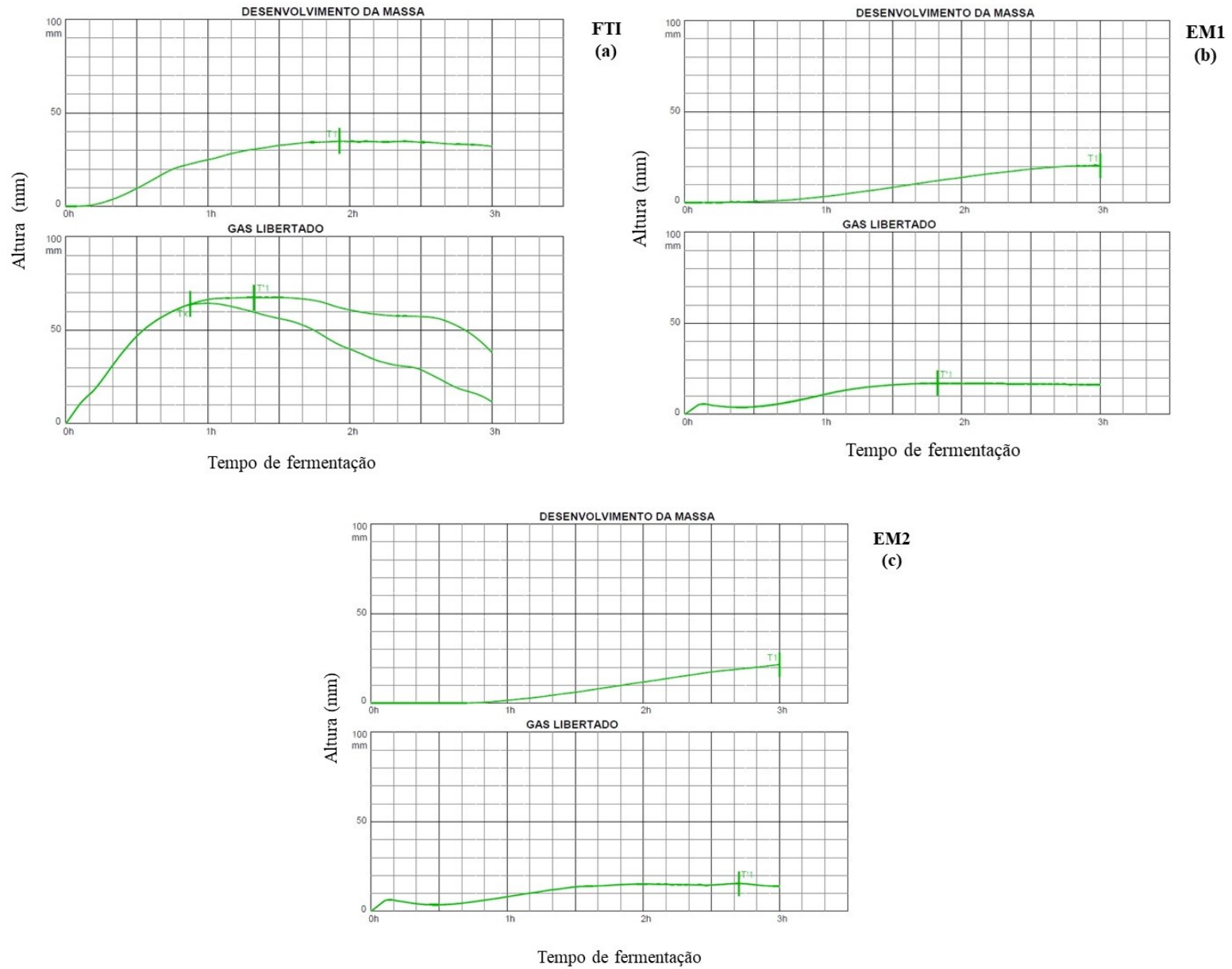
Tabela 3. Espectrometria de massas por transições MRM no monitoramento de íons em modo positivo $[M + H]^+$ e negativo $[M - H]^-$ *

Composto	Íon precursor (ESI)	Transição (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Ácido benzoico	122,9 ^a	79,0 ^c	36	10	17	12
		51,0	36	10	51	24
Ácido <i>p</i> -Aminobenzoico	138,0 ^a	77,0 ^c	56	10	29	10
		94,0	56	10	19	8
Cumarina	146,9 ^a	90,9 ^c	126	10	31	10
		103,0	126	10	23	8
2,4- Ácido Diidroxibenzoico	155,0 ^a	109,9 ^c	41	10	29	20
		137,0	41	10	19	8
2,5- Ácido Diidroxibenzoico	155,0 ^a	137,0 ^c	41	10	19	8
		114,0	41	10	29	52
Siringaldeido	183,0 ^a	123,1 ^c	41	10	17	8
		77,0	41	10	31	10
Ácido ferúlico	195,0 ^a	176,9 ^c	21	10	11	10
		89,0	21	10	41	10
Ácido siringico	199,0 ^a	140,0 ^c	16	10	21	10
		155,1	16	10	13	10
Pinocembrina	257,0 ^a	153,0 ^c	96	10	33	10
		76,9	96	10	73	10
Galangina	271,0 ^a	153,0 ^c	176	10	43	10
		115,1	176	10	59	8
Apigenina	271,0 ^a	153,0 ^c	181	10	41	10
		90,9	181	10	49	14
Luteolina	286,9	153,0 ^c	111	10	43	10
		68,9	111	10	89	10
Kaempferol	286,9 ^a	153,0 ^c	111	10	43	10
		68,9	111	10	89	10
(-)-Epicatequina	291,0 ^a	138,9 ^c	36	10	21	8
		123,0	36	10	21	8
(+) -Catequina	291,0 ^a	139,0 ^c	16	10	21	10
		123,0	16	10	19	8
Ácido clorogênico	355,1 ^a	163,0 ^c	46	10	21	10
		89,0	46	10	75	14
Hesperidina	611,2 ^a	303,0 ^c	51	10	31	16
		153,1	51	10	67	10
Ácido sailicilico	136,9 ^b	93,1 ^c	-15	-10	-22	-5
		64,9	-15	-10	-36	-11
3,4- Ácido diidroxibenzoico	152,9 ^b	109,0 ^c	-75	-10	-20	-7
		90,9	-75	-10	-32	-13
Ácido <i>p</i> -Cumarico	162,9 ^b	119,0 ^c	-90	-10	-20	-7
		93,0	-90	-10	-40	-5
Ácido vanílico	166,9 ^b	137,0 ^c	-140	-10	-12	-9
		109,1	-140	-10	-16	-7

Ácido gálico	168,9 ^b	124,9 ^c	-110	-10	-20	-7
		79,0	-110	-10	-30	-11
4-Metilumbeliferona	174,9 ^b	133,0 ^c	-135	-10	-28	-9
		119,1	-135	-10	-36	-7
Coniferaldeido	177,0 ^b	134,0 ^c	-30	-10	-28	-9
		160,8	-30	-10	-28	-11
Ácido cafeico	178,9 ^b	135,0 ^c	-115	-10	-22	-9
		107,0	-115	-10	-30	-7
Sinapaldeido	206,9 ^b	177,0 ^c	-20	-10	-26	-11
		148,9	-20	-10	-34	-9
3,5- Ácido dinitrobenzoico	210,9 ^b	167,0 ^c	-50	-10	-14	-9
		136,9	-50	-10	-22	-9
Ácido sináptico	223,0 ^b	163,9 ^c	-120	-10	-20	-9
		192,9	-120	-10	-28	-11
Crisina	252,9 ^b	142,9 ^c	-170	-10	-36	-9
		209,1	-170	-10	-30	-11
Naringenina	270,9 ^b	151,0 ^c	-130	-10	-24	-25
		119,0	-130	-10	-34	-11
Pinobanksina	270,9 ^b	150,9 ^c	-140	-10	-24	-9
		119,1	-140	-10	-32	-7
Quercetina	301,0 ^b	150,9 ^c	-50	-10	-28	-9
		121,0	-50	-10	-34	-7
Isorhamnetina	315,0 ^b	300,0 ^c	-225	-10	-28	-15
		150,9	-225	-10	-38	-9
(–)- Galato de epigallocatequina	457,0 ^b	169,0 ^c	-165	-10	-20	-11
		125,0	-165	-10	-52	-9
Isoquercetina	462,9 ^b	300,0 ^c	-215	-10	-36	-15
		271,0	-215	-10	-56	-13
Naringina	579,0 ^b	271,0 ^c	-255	-10	-42	-13
		151,0	-255	-10	-48	-9
Quercetina-3-rutinoside	609,0 ^b	299,9 ^c	-230	-10	-48	-15
		270,9	-230	-10	-32	-9

*Dados adaptados de Seraglio et al. (2016). PD: potencial de desagrupamento; (V); PE: potencial de entrada (V); EC: energia de colisão (V); PSC: potencial de saída de colisão (V); ^a íon modo positivo; ^b íon modo negativo; ^c íon de quantificação.

Figura 1. Comportamento do desenvolvimento da massa e produção/liberação de gás das massas de pães elaboradas pela incorporação de erva-mate na FTI.



APÊNDICE C – Material referente ao artigo do capítulo 4

Figura 1. Distribuição do tamanho de partícula da erva-mate fina (a) e erva-mate média (b).

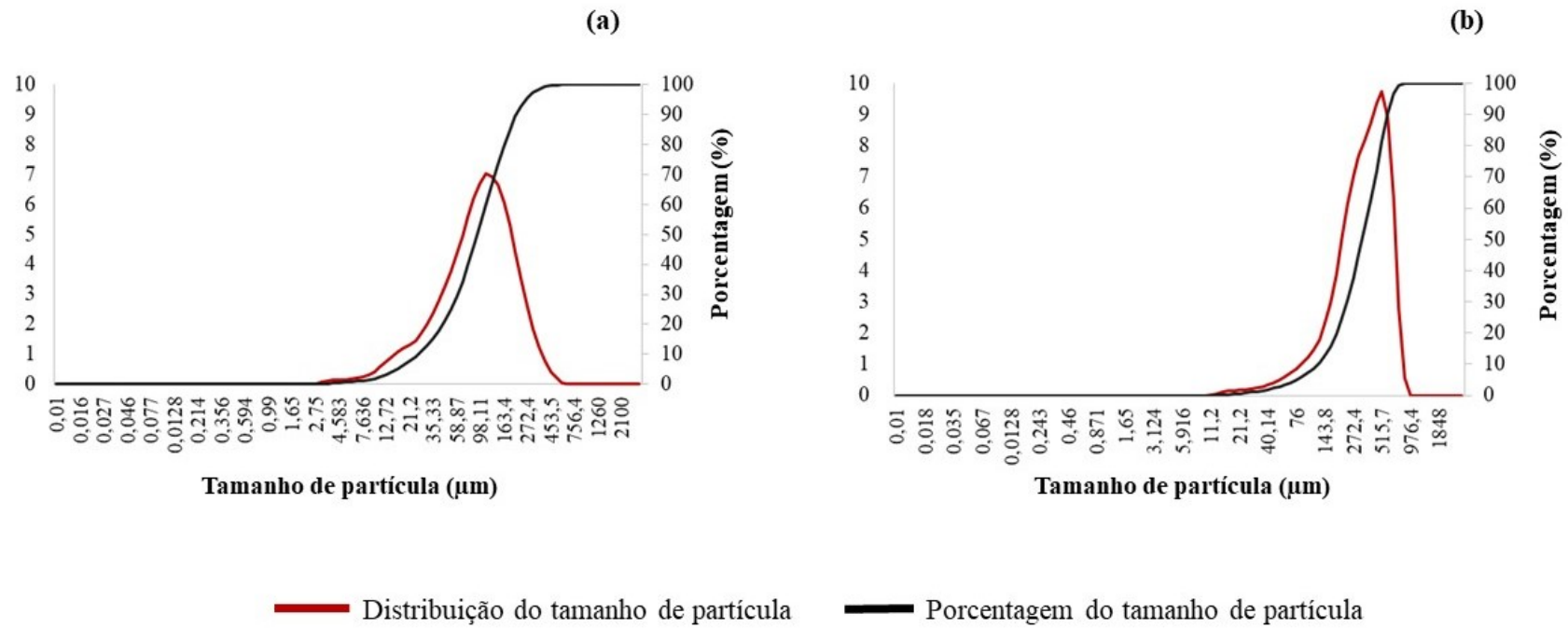


Tabela 1. Compostos fenólicos livres identificados provisoriamente por LC-MS^E separados por classes e em ordem de tempo de retenção.

FLAVONOIDES																									
Número	Nome (composto)	Fórmula molecular	m/z	TR (min)	Score (%)	SF (%)	Dados fragmentados (% intensidade relativa)	EM (ppm)	SI (%)	FENÓLICOS LIVRES															
										F	F1	F2	F3	F4	D	D1	D2	D3	D4	B	B1	B2	B3	B4	
1	kaempferol 3-o-rutinosídeo	C27H30O15	593,1490	6,02	39,6	9,3	197.0455 (6.54%)	-3,7	93,2					X										X	
2	epicatequina	C15H14O6	289,0720	7,11	42,9	20,6	176.0478 (43.73%)	0,7	94,7																
3	isômero apigenina 7-o- apiosil-glucosídeo I	C26H28O14	563,1379	7,32	50,8	61,7	353.0667 (60.44%), 443.0983 (12.31%), 473.1089 (7.96%), 325.0717 (2.07%), 365.0667 (1.43%)	-4,9	97,6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4	isômero o-malonilglicitina I	C25H24O13	531,1133	7,32	55,9	88,5	513.1038 (100.00%), 248.0537 (8.70%), 487.1245 (6.90%), 313.0717 (5.61%), 101.0396 (3.26%)	-2,2	93,6		X	X	X	X											X
5	isômero apigenina 7-o- apiosil-glucosídeo II	C26H28O14	563,1406	7,53	57,7	90,3	563.1406 (100.00%), 353.0667 (74.95%), 383.0772 (45.92%), 443.0983 (12.86%), 473.1089 (6.94%), 365.0667 (2.18%), 503.1195 (2.00%), 413.08787 (1.83%), 425.0878 (1.82%), 397.0928 (0.82%)	0,0	98,1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6	isômero o-malonilglicitina II	C25H24O13	531,1156	7,82	54,2	83,7	513.1038 (100.00%)	2,3	90,2		X	X	X	X							X		X	X	
7	apigenina 6-c-glucosídeo	C21H20O10	431,0967	7,84	47,7	50,5	339.0510 (100.00%), 387.1085 (5.12%), 81.0345 (0.67%)	-3,8	92,3			X				X		X				X		X	
8	apigenina 7-o-glucosídeo	C21H24O9	419,1353	8,07	40,2	14,3	131.0502 (2.84%), 271.0975 (1.17%), 375.1085 (1.08%), 311.0924 (0.81%)	1,2	88,1									X						X	
9	kaempferol 3,7-o- diglucosídeo	C27H30O16	609,1467	8,07	53,1	71,1	300.0275 (100.00%), 151.0037 (3.44%), 271.0278 (3.14%), 255.0299 (2.01%), 343.0459 (1.20%), 273.0404 (0.48%)	1,0	95,5		X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	
10	glicitina	C22H22O10	445,1132	8,11	50,0	57,1	327.0874 (100.00%), 401.1241 (66.97%), 312.0639 (30.39%), 371.0772 (11.22%), 385.0929 (4.40%)	-1,8	95,2			X	X			X	X	X	X			X	X	X	
11	quercetina 3-o-glucosídeo	C21H20O12	463,0866	8,28	41,9	14,9	101.0244 (90.61%), 271.0248 (18.12%), 255.0298 (8.44%)	-3,4	98,6			X				X	X	X	X		X	X	X	X	
12	diosmina	C28H32O15	607,1628	8,32	40,8	21,2	193.0506 (67.68%), 121.0295 (28.11%), 159.0451 (19.96%), 165.0557 (16.37%), 385.0928 (13.00%), 175.0400 (10.05%), 89.0244 (9.79%), 217.0506 (7.39%), 311.0561 (6.97%), 252.0428 (2.52%), 177.0557 (2.49%), 446.1218 (2.32%), 91.0189 (1.80%)	-6,7	90,3								X		X			X	X	X	

13	florizina	C21H24O10	435,1283	8,32	44,6	34,1	267.0663 (100.00%), 326.0796 (36.97%), 189.0557 (24.10%), 159.0451 (19.96%), 239.0713 (14.31%), 173.0608 (13.90%), 385.0929 (13.00%), 89.0244 (9.79%), 203.0713 (8.41%), 91.0189 (1.80%)	-3,0	92,5												X		X		X			X		X	
14	isômero tetrametilscutelareína I	C19H18O6	341,1029	8,33	44,5	24,8	341.1030 (79.96%), 193.0506 (67.68%), 165.0557 (16.37%), 175.0400 (10.05%), 260.0690 (0.62%)	-0,6	98,4												X	X	X	X		X	X	X		X	X
15	daidzin	C21H20O9	415,1037	8,48	46,9	53,4	144.0428 (100.00%), 323.0772 (10.16%), 116.0478 (5.47%), 167.0350 (2.88%)	0,5	81,9													X		X			X	X			
16	isorhamnetina 3-o-glucosideo / isorhamnetina 3-o-galactosideo	C22H22O12	477,1053	8,53	51,1	68,0	285.0404 (100.00%), 151.0400 (20.79%), 111.0451 (7.95%), 257.0455 (1.86%), 327.0510 (1.24%)	3,1	91,2												X		X	X				X	X	X	
17	luteolina 7-o-rutinosideo	C27H30O15	593,1503	8,55	53,9	72,0	173.0455 (100.00%), 515.1192 (33.27%), 353.0878 (29.56%), 159.0451 (10.87%), 109.0295 (5.40%), 123.0451 (2.99%), 93.0345 (2.72%), 111.0451 (2.20%), 91.0189 (1.38%), 257.0455 (0.51%), 327.0510 (0.34%)	-1,5	99,3												X	X	X	X		X	X	X	X	X	
18	isômero tetrametilscutelareína II	C19H18O6	341,1019	8,69	43,5	23,1	326.0796 (16.68%), 311.0924 (9.33%), 327.1237 (5.97%), 160.0529 (3.30%), 324.1003 (2.09%), 243.0662 (1.00%)	-3,3	98,0												X	X	X	X		X	X	X	X	X	
19	luteolina-6-c-glucosideo	C21H20O11	447,0921	8,77	43,5	25,5	137.0244 (100.00%), 89.0244 (22.18%), 125.0244 (21.14%), 71.0138 (19.59%), 233.0666 (17.74%), 255.0298 (2.69%)	-2,6	95,3												X		X	X	X		X	X	X	X	
20	pebreлина	C19H18O8	373,0928	8,87	41,5	12,8	314.0796 (20.65%)	-0,2	95,2													X									
21	eupatorina / isômero cirsilineol I	C18H16O7	343,0821	9,07	49,2	51,8	269.0455 (100.00%), 241.0506 (65.08%), 343.0823 (21.95%), 299.0924 (15.95%), 285.0769 (10.95%), 271.0611 (9.99%), 326.0796 (8.54%), 239.0350 (2.64%)	-0,7	94,8													X	X		X		X	X		X	
22	metil-epigalocatequina	C16H16O7	319,0824	9,10	43,2	21,9	285.0768 (27.06%), 271.0611 (24.69%)	0,1	94,3												X			X							
23	o-acetilglicitina	C24H24O11	487,1248	9,12	44,3	25,0	323.0772 (33.61%), 487.1246 (24.85%)	0,4	97,1												X	X	X	X		X	X	X	X	X	
24	eriodictiol	C15H12O6	287,0549	9,30	38,9	9,8	163.0400 (49.56%)	-4,4	89,8															X				X	X		
25	irisolidone	C17H14O6	313,0696	9,59	37,2	2,8	201.0557 (0.44%)	-6,8	91,0												X	X									
26	naringenina 7-o-glucosideo	C21H22O10	433,1141	9,59	43,5	27,1	216.0639 (6.83%), 323.0772 (1.27%), 201.0557 (0.44%)	0,3	90,9												X	X		X	X	X	X	X	X	X	
27	gardenina b	C19H18O7	357,0970	9,73	38,4	2,3	161.0608 (8.17%)	-2,6	92,7															X							
28	butin	C15H12O5	271,0595	9,75	39,8	10,2	239.0350 (2.10%), 203.0350 (1.13%), 256.0377 (0.75%)	-6,2	96,0												X	X	X	X		X	X	X	X	X	

82	NID7	C25H24O13	531,1131	6,66	44,2	26,0	295.0612 (100.00%), 171.0299 (28.22%)	-2,4	97,8		X	X	X	X		X	X						X		X
83	NID8	C24H24O11	487,1239	7,35	41,0	15,5	248.0479 (13.60%), 313.0717 (8.77%), 101.0396 (5.09%), 301.0929 (2.75%)	-1,3	90,9		X	X	X	X									X		X
84	NID10	C25H24O13	531,1137	7,53	56,6	95,0	353.0667 (100.00%), 383.0772 (61.27%), 443.0983 (17.16%), 473.1089 (9.26%), 297.0768 (4.75%), 365.0667 (2.97%), 503.1195 (2.67%), 413.0878 (2.44%), 425.0878 (2.43%), 397.0928 (1.09%)	-1,3	89,7														X		X
85	NID11	C21H24O10	435,1289	8,19	39,6	9,1	161.0455 (62.55%), 153.0193 (55.91%)	-1,7	91,2		X														X
86	NID13	C24H24O11	487,1238	8,33	40,6	7,4	162.0322 (100.00%)	-1,6	97,4		X	X	X	X										X	X
87	NID14	C25H24O13	531,1155	8,44	46,3	44,0	329.0666 (48.34%), 271.0459 (41.87%)	2,1	89,9		X		X	X										X	X
88	NID15	C19H18O8	373,0925	8,67	38,9	0,3	160.0530 (3.30%)	-1,0	95,3		X		X	X		X									
89	NID16	C25H24O13	531,1150	8,75	51,5	68,8	516.1273 (100.00%), 93.0343 (39.61%), 155.0349 (37.12%), 403.1034 (6.20%), 129.0123 (1.76%), 205.0354 (1.15%)	1,0	89,8		X	X	X												X
90	NID17	C22H22O12	477,1035	8,87	39,0	2,5	258.0533 (3.66%)	-0,8	93,7			X			X	X	X	X					X	X	X
91	NID19	C19H18O8	373,0934	9,07	38,9	6,1	191.0713 (91.47%)	1,2	89,8			X				X								X	
92	NID20	C15H14O6	289,0698	9,76	48,6	53,4	277.0717 (91.26%), 203.0350 (31.82%)	-6,8	97,2				X						X	X	X				
93	NID21	C21H20O9	415,1022	9,78	40,5	12,8	197.0455 (31.93%), 219.0292 (16.72%)	-3,0	93,1			X													
94	NID22	C21H20O10	431,0984	10,05	40,7	6,2	386.1007 (0.52%)	0,1	97,4						X										
95	NID23	C18H16O7	343,0810	10,30	50,1	62,8	311.0924 (84.18%), 296.0690 (17.38%)	-3,8	92,2																
96	NID18	C21H24O10	435,1314	10,44	42,4	30,1	287.0924 (16.46%), 355.0823 (15.03%), 225.0557 (2.79%)	4,0	86,8		X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X
DERIVADOS DE ÁCIDOS FENÓLICOS																									
97	NID1	C8H8O5	183,0287	1,66	37,9	2,7	126.0322 (1.76%)	-6,7	94,5													X			
98	NID2	C7H6O5	169,0131	3,14	56,2	95,5	152.0115 (100.00%)	-6,7	93,2						X	X	X			X	X			X	
99	NID3	C9H10O5	197,0444	4,26	48,0	57,1	136.0165 (100.00%), 151.0400 (39.62%)	-5,8	89,6						X					X		X	X		
100	NID4	C10H12O5	211,0601	5,35	50,1	67,8	161.0244 (100.00%), 177.0557 (31.51%), 147.0451 (16.06%)	-5,1	88,6				X												
101	NID5	C18H16O8	359,0757	5,78	41,7	32,8	221.0455 (100.00%), 251.0561 (40.65%)	-4,2	80,7																
102	NID9	C16H18O8	337,0912	7,44	39,1	8,5	75.0087 (14.80%), 167.0350 (14.01%)	-5,0	92,9		X	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X
103	NID12	C20H22O8	389,1233	8,21	39,7	10,5	161.0455 (62.55%), 153.0193 (55.91%)	-2,3	90,7		X	X	X	X		X	X	X		X	X			X	X
104	NID21	C25H24O12	515,1194	8,99	48,8	45,1	311.0772 (87.28%), 375.0721 (26.44%)	-0,2	99,0		X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X

m/z: massa/carga. TR: tempo de retenção. SF: score de fragmentação. SI: semelhança isotópica. EM: erro em massa. Negrito representa padrões de referência.

29	eupatorina / isômero cirsilineol II	C18H16O7	343,0812	9,96	45,9	33,5	283.0611 (14.52%), 241.0506 (4.91%), 255.0662 (3.12%), 252.0428 (0.87%)	-3,1	99,4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
30	quercetina 3-o-glucosil-ramnosil-galactosideo	C33H40O21	771,1948	10,05	38,2	1,5	164.0690 (22.60%), 146.0584 (14.80%)	-5,3	95,7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
31	isômero tetrametilscutelareína III	C19H18O6	341,1015	10,14	38,8	2,8	341.1030 (85.36%), 255.0663 (5.71%)	-4,6	96,3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
32	quercetina	C15H10O7	301,0343	10,21	37,2	0,0	0	-3,7	90,5	X	X	X	X			X	X	X	X		X	X	X	X
33	hesperetina / homoeriodictiol	C16H14O6	301,0705	10,26	46,6	50,6	269.0455 (100.00%), 286.0483 (97.50%), 165.0193 (51.31%), 212.0478 (39.63%), 267.0299 (23.32%), 211.0400 (17.30%), 227.0350 (10.52%), 229.0506 (9.67%), 244.0377 (5.30%), 152.0115 (4.66%)	-4,2	87,1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
34	nobiletina	C21H22O8	401,1261	10,37	39,6	12,7	195.0663 (100.00%), 161.0608 (7.97%)	4,7	90,6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
35	cirsimaritina	C17H14O6	313,0706	10,48	47,2	47,5	99.0451 (100.00%), 267.0663 (8.78%)	-3,7	93,0	X			X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
LIGNANAS																								
36	1-acetoxipinoresinol	C22H24O8	415,1433	9,26	43,2	32,4	165.0557 (4.93%), 357.1343 (3.48%), 373.1292 (2.17%)	8,4	92,8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OUTROS POLIFENÓIS																								
37	umbeliferona	C9H6O3	161,0246	0,81	46,7	43,1	115.0189 (100.00%)	1,2	91,9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
38	4-methoxibenzaldeido	C8H8O2	135,0441	4,17	44,3	37,1	93.0336 (49.34%), 107.0491 (19.40%)	-7,6	93,0															
39	isômero vanilina I	C8H8O3	151,0387	4,28	47,6	52,3	136.0166 (100.00%)	-9,2	95,9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
40	ácido vanilático	C10H12O5	211,0604	4,30	49,3	55,4	136.0166 (100.00%), 151.0400 (39.62%)	-4,0	95,8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
41	isômero álcool homovanílico I	C9H12O3	167,0701	6,07	51,6	73,9	121.0295 (100.00%), 97.0295 (42.54%), 149.0608 (29.87%), 167.0713 (26.24%), 125.0608 (23.43%), 117.0346 (20.05%), 97.0658 (13.27%), 69.0346 (8.08%), 121.0658 (1.84%), 95.0502 (1.38%)	-7,3	92,1		X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X
42	esculetina	C9H6O4	177,0179	6,14	52,4	72,4	153.0193 (100.00%), 148.0166 (6.56%), 104.0267 (5.92%), 135.0087 (4.85%), 67.0189 (4.35%), 120.0216 (2.05%)	-8,2	98,6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
43	isômero álcool homovanílico II	C9H12O3	167,0702	6,24	43,8	34,6	121.0295 (28.13%), 97.0295 (10.04%), 167.0713 (6.76%), 125.0608 (6.01%), 97.0658 (3.21%), 69.0346 (1.77%)	-6,9	92,2		X	X		X		X	X	X				X		
44	vanilina	C8H8O3	151,0392	7,17	37,9	0,0	0	-5,9	96,0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
45	meleina	C10H10O3	177,0548	8,82	53,5	81,8	149.0608 (100.00%)	-4,9	91,4										X	X		X	X	
46	[6]-gingerol	C17H32O4	299,2205	12,48	54,3	82,8	255.1602 (55.09%), 211.1703 (35.94%), 111.0815 (30.38%)	-7,7	97,5	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X		X	X
ÁCIDOS FENÓLICOS																								

APÊNDICE D - Material referente ao artigo do capítulo 5

Tabela 1. Composição química dos pães com e sem adição de erva-mate

Composição química	P1	P2	P FTI
Umidade (g/100 g)	38,54 ± 0,04	36,86 ± 0,07	37,71 ± 0,02
Proteínas (g/100 g bs)	24,40 ± 0,04	23,58 ± 0,04	23,64 ± 0,04
Lipídios (g/100 g bs)	12,65 ± 0,04	10,92 ± 0,13	9,54 ± 0,10
Cinzas (g/100 g bs)	5,48 ± 0,04	5,34 ± 0,04	5,12 ± 0,02
Fibra alimentar total (g/100 g bs)	43,76 ± 1,29	58,09 ± 2,44	46,35 ± 5,13
Fibra solúvel (g/100 g bs)	2,09 ± 0,38	3,86 ± 2,44	8,24 ± 0,39
Fibra insolúvel (g/100 g bs)	88,66 ± 0,90	92,01 ± 0,09	74,41 ± 4,74
Atividade de água (a _w)	0,93 ± 0,01	0,93 ± 0,01	0,91 ± 0,01

Cada valor é apresentado como média ± desvio padrão (n=3). P FTI: Pão integral. P1: Pão com 2,5% EM (g erva-mate/100 g FTI). P2: Pão com 4,5% EM (g erva-mate/100 g FTI). EM: Erva-mate; FTI: Farinha de trigo integral

Tabela 2. Espectrometria de massas por transições MRM no monitoramento de íons em modo positivo $[M + H]^+$ e negativo $[M - H]^-$ *

Composto	Íon precursor (ESI)	Transição (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Ácido benzoico	122,9 ^a	79,0 ^c	36	10	17	12
		51,0	36	10	51	24
Ácido <i>p</i> -Aminobenzoico	138,0 ^a	77,0 ^c	56	10	29	10
		94,0	56	10	19	8
Cumarina	146,9 ^a	90,9 ^c	126	10	31	10
		103,0	126	10	23	8
2,4- Ácido Diidroxibenzoico	155,0 ^a	109,9 ^c	41	10	29	20
		137,0	41	10	19	8
2,5- Ácido Diidroxibenzoico	155,0 ^a	137,0 ^c	41	10	19	8
		114,0	41	10	29	52
Siringaldeido	183,0 ^a	123,1 ^c	41	10	17	8
		77,0	41	10	31	10
Ácido ferúlico	195,0 ^a	176,9 ^c	21	10	11	10
		89,0	21	10	41	10
Ácido siringico	199,0 ^a	140,0 ^c	16	10	21	10
		155,1	16	10	13	10
Pinocembrina	257,0 ^a	153,0 ^c	96	10	33	10
		76,9	96	10	73	10
Galangina	271,0 ^a	153,0 ^c	176	10	43	10
		115,1	176	10	59	8
Apigenina	271,0 ^a	153,0 ^c	181	10	41	10
		90,9	181	10	49	14
Luteolina	286,9	153,0 ^c	111	10	43	10
		68,9	111	10	89	10
Kaempferol	286,9 ^a	153,0 ^c	111	10	43	10
		68,9	111	10	89	10
(-)-Epicatequina	291,0 ^a	138,9 ^c	36	10	21	8
		123,0	36	10	21	8
(+) -Catequina	291,0 ^a	139,0 ^c	16	10	21	10
		123,0	16	10	19	8
Ácido clorogênico	355,1 ^a	163,0 ^c	46	10	21	10
		89,0	46	10	75	14
Hesperidina	611,2 ^a	303,0 ^c	51	10	31	16
		153,1	51	10	67	10
Ácido sailcilico	136,9 ^b	93,1 ^c	-15	-10	-22	-5
		64,9	-15	-10	-36	-11
3,4- Ácido diidroxibenzoico	152,9 ^b	109,0 ^c	-75	-10	-20	-7
		90,9	-75	-10	-32	-13
Ácido <i>p</i> -Cumarico	162,9 ^b	119,0 ^c	-90	-10	-20	-7
		93,0	-90	-10	-40	-5
Ácido vanílico	166,9 ^b	137,0 ^c	-140	-10	-12	-9
		109,1	-140	-10	-16	-7

Ácido gálico	168,9 ^b	124,9 ^c	-110	-10	-20	-7
		79,0	-110	-10	-30	-11
4-Metilumbeliferona	174,9 ^b	133,0 ^c	-135	-10	-28	-9
		119,1	-135	-10	-36	-7
Coniferaldeido	177,0 ^b	134,0 ^c	-30	-10	-28	-9
		160,8	-30	-10	-28	-11
Ácido cafeico	178,9 ^b	135,0 ^c	-115	-10	-22	-9
		107,0	-115	-10	-30	-7
Sinapaldeido	206,9 ^b	177,0 ^c	-20	-10	-26	-11
		148,9	-20	-10	-34	-9
3,5- Ácido dinitrobenzoico	210,9 ^b	167,0 ^c	-50	-10	-14	-9
		136,9	-50	-10	-22	-9
Ácido sináptico	223,0 ^b	163,9 ^c	-120	-10	-20	-9
		192,9	-120	-10	-28	-11
Crisina	252,9 ^b	142,9 ^c	-170	-10	-36	-9
		209,1	-170	-10	-30	-11
Naringenina	270,9 ^b	151,0 ^c	-130	-10	-24	-25
		119,0	-130	-10	-34	-11
Pinobanksina	270,9 ^b	150,9 ^c	-140	-10	-24	-9
		119,1	-140	-10	-32	-7
Quercetina	301,0 ^b	150,9 ^c	-50	-10	-28	-9
		121,0	-50	-10	-34	-7
Isorhamnetina	315,0 ^b	300,0 ^c	-225	-10	-28	-15
		150,9	-225	-10	-38	-9
Isoquercetina	462,9 ^b	300,0 ^c	-215	-10	-36	-15
		271,0	-215	-10	-56	-13
Naringina	579,0 ^b	271,0 ^c	-255	-10	-42	-13
		151,0	-255	-10	-48	-9
Quercetina-3-rutinoside	609,0 ^b	299,9 ^c	-230	-10	-48	-15
		270,9	-230	-10	-32	-9

*Dados adaptados de Seraglio *et al.* (2016). PD: potencial de desagrupamento; (V); PE: potencial de entrada (V); EC: energia de colisão (V); PSC: potencial de saída de colisão (V); ^a íon modo positivo; ^b íon modo negativo; ^c íon de quantificação.

ANEXOS

ANEXO A – Primeira página do artigo referente ao capítulo 2 publicado na revista *Journal of Food Science*.

Received: 21 June 2021 | Revised: 29 July 2021 | Accepted: 12 August 2021

DOI: 10.1111/1750-3841.15909

INTEGRATED FOOD SCIENCE

Food Science WILEY

Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves on dough properties, antioxidant activity, and bread quality using whole wheat flour

Gabriela Soster Santetti¹ | Marina Volpato Dacoreggio¹ |
 Ana Carolina Mattana Silva² | Barbara Biduski³ | Joseane Bressiani⁴ |
 Tatiana Oro³ | Alicia de Francisco¹ | Luiz Carlos Gutkoski⁵ |
 Renata Dias de Mello Castanho Amboni¹

¹ Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina 88034-001, Brazil

² Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil

³ Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴ Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

⁵ Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição (PPGAN), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence

Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88034-001, Brazil.

Email: renata.amboni@ufsc.br

Abstract: This study investigated the effects of different yerba mate (YM) proportions (1.5, 2.5, and 4.5 g YM/100 g whole wheat flour (WWF) and particle sizes (245, 415.5, and 623.9 μm) on dough rheological properties, antioxidant activity, and bread characteristics. The addition of YM leaves led to a possible interaction between its phenolic compounds and the gluten network within the dough, without negative effects on dough formation. However, the larger YM particle size (623.9 μm) caused a weakening of the protein network, resulting in lower quality product compared to the other samples. Improved bread quality was found when the YM leaves were added at 2.5 g YM/100 g WWF. The total amount of phenolic compounds and the antioxidant activity increased as the proportion of YM increased in both flour and bread. Moreover, the phenolic compounds in 2.5 g YM/100 g WWF breads were stable during baking, showing no significant losses in the amount of phenolic compounds and antioxidant activity. These results suggest the YM can be successfully incorporated into baked product, improving its functional characteristics.

Practical Application: This study evaluates the technological quality of bakery product made by incorporating yerba mate leaves in whole wheat flour. The results will contribute to the production of a bread with greater functional properties due to the presence of polyphenols and phytochemicals.

KEYWORDS

bakery products, functional product, *Ilex paraguariensis*, phenolic compounds, whole meal bread

1 | INTRODUCTION

Consumers are becoming more aware about the ingredients used in food products. This increased attention provides an opportunity to develop new products with impr-

oved nutritional and functional content that align with the current market, such as the incorporation of fiber, fruits, vegetables, and whole grains. This significantly increase the interest for whole wheat flours (WWFs) and bread (Cappelli & Cini, 2021; Cappelli et al., 2021).

ANEXO B – Primeira página do artigo referente ao capítulo 3 publicado na revista *LWT-Food Science and Technology*.

LWT - Food Science and Technology 146 (2021) 111442



Contents lists available at ScienceDirect

LWT

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt



The addition of yerba mate leaves on bread dough has influences on fermentation time and the availability of phenolic compounds?

Gabriela Soster Santetti ^a, Marina Volpato Dacoreggio ^a, Heloisa Patrício Inácio ^a, Barbara Biduski ^b, Rodrigo Barcellos Hoff ^c, Carlise Beddin Fritzen Freire ^a, Luiz Carlos Gutkoski ^d, Renata Dias de Mello Castanho Amboni ^{a,*}

^a Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88034-001, Brazil

^b Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Rio Grande Do Sul, Passo Fundo, RS, 99052-900, Brazil

^c Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, São José, SC, 88102-600, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação Em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal Do Estado Do Rio de Janeiro, 22290-240, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Bakery products
Bioactive compounds
Fermentation behavior
Ilex paraguariensis
Whole wheat flour

ABSTRACT

This study investigated the effect of different fermentation times of dough made with whole wheat flour (WWF) added with yerba mate (YM), and the effect on rheological behavior, release of phenolic compounds, and antioxidant activity. Three treatments were evaluated: YM1 (2.5%; w/w), YM2 (4.5%; w/w), and the control sample (0%). The dough fermentative behavior showed an alteration in CO₂ production, and dough volume was reduced in the presence of YM. The addition of YM, together with the fermentation process, increased the free, bound, and total phenolic content, as well as the antioxidant activity of the dough. The addition of 4.5% of YM showed higher content for free phenolic compounds on the dough after the fermentation. 26 phenolic compounds were identified in the dough samples. Rutin was the main compound in doughs with YM, comprising 79% and 61% of total phenolic content of YM2 and YM1, respectively. The phenolic profile demonstrated that fermentation times of 30 and 60 min released greater amounts of compounds in the three studied doughs, mostly caffeic acid, ferulic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, isoquercetin, and rutin. These results suggest that the dough fermentation process may be a determining factor for the release of phenolic compounds.

1. Introduction

In recent years, research has shown the potential of plants as sources of bioactive compounds for the production of functional and nutraceutical foods, i.e., foods that provide both basic nutrition and health benefit as reducing the risk of chronic disease (Santini & Novellino, 2018). For example, *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., also known as yerba mate (YM), has been widely consumed in several countries in South America, mainly as a beverage, but also as a natural antioxidant in some industrial formulated products. The plant is known to have pharmacological properties, including antioxidant, anti-inflammatory, and anti-tumor activities (Bracesco, Sanchez, Contreras, Menini, & Gugliucci, 2011; Ferrario, Schenk, Carrillo, & Guerrero, 2018). The beneficial properties of yerba mate are mainly associated with the high content of phenolic compounds, found predominantly in its leaves

(Ferrario et al., 2018).

Several studies have reported the incorporation of polyphenols from different plant sources into bakery products, such as bread, cakes, and cookies, aiming to improve their functional properties (Gómez & Martínez, 2018; Ou, Wang, Zheng, & Or, 2019). However, it is known that these compounds are very reactive and sensitive to processing, and they can also interact with raw materials and compounds that are formed during mixing, fermentation, and baking.

Whole wheat flour (WWF) is an alternative for the bakery industry, because it has high dietary fiber content and important micronutrients, such as vitamins and antioxidants (Cappelli, Guerrini, Cini, & Parenti, 2019). In bread production, the characteristics of the final product depend on flour quality and processing, since the components present in dough can be changed. In addition, the fermentation process can lead to modifications in the technological and functional characteristics of the

* Corresponding author.

E-mail addresses: gs_santetti@hotmail.com (G.S. Santetti), maarivolpato@hotmail.com (M.V. Dacoreggio), helo.patricio@gmail.com (H.P. Inácio), babi_biduski@hotmail.com (B. Biduski), rodrigo.hoff@agricultura.gov.br (R.B. Hoff), carlisebf@hotmail.com (C.B. Fritzen Freire), renata.amboni@ufsc.br (R.D.M.C. Amboni).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111442>

Received 28 October 2020; Received in revised form 31 March 2021; Accepted 2 April 2021

Available online 12 April 2021

0023-6430/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANEXO C – Primeira página do artigo referente ao capítulo 4 publicado na revista *Food Research International*



Untargeted metabolomics analysis reveals improved phenolic profile in whole wheat bread with yerba mate and the effects of the bread-making process

Gabriela Soster Santetti^a, Luciana Ribeiro da Silva Lima^b, Barbara Biduski^c, Millena Cristina Barros Santos^{b,d}, Carolina Thomaz dos Santos D'Almeida^b, Luiz Claudio Cameron^d, Luiz Carlos Gutkoski^b, Mariana Simões Larraz Ferreira^{b,d}, Renata Dias de Mello Castanho Amboni^{a,*}

^a Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga 1346, 88034-000, Florianópolis, SC, Brazil
^b Laboratory of Bioactives, Food and Nutrition Graduate Program (PPGAN), Federal University of State of Rio de Janeiro, UNIRIO, Av. Pasteur, 296, Urca, 22290-240 Rio de Janeiro, Brazil
^c Food Science and Technology Graduate Program, University of Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Passo Fundo, RS 99052-900, Brazil
^d Laboratory of Protein Biochemistry, Center for Innovation in Mass Spectrometry, UNIRIO, Av. Pasteur, 296, Urca, 22290-240 Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Mass spectrometry
 Bioactive compounds
 Polyphenols
 Bakery products
 Bread-making process
 Multivariate analysis

ABSTRACT

Untargeted metabolomics analysis was applied to evaluate the phenolic profile of whole wheat bread with yerba mate (YM) during the bread-making process (flour, dough and bread). The free, bound and total phenolic contents of the samples evaluated by the Folin-Ciocalteu method showed the highest values for the flour, dough and bread samples prepared with 4.5% YM in fine and medium particle sizes (flour 181.48 – 175.26 mg GAE/g; dough 149.62 – 141.40 mg GAE/g; and bread 148.32 – 147.00 mg GAE/g). Globally, 104 phenolic compounds were tentatively identified, belonging to the five subclasses: flavonoids (35), phenolic acids (32), other polyphenols (10), stilbenes (2) and lignan (1). Of these compounds, 24 had the same *m/z* but showed different fragmentation profiles. A higher number of polyphenols was identified in the bound extracts (77%) than in the free extracts (59%). The addition of 4.5% of YM promoted an improved and more abundant profile of phenolic compounds in the dough and bread. The major compounds found in the samples containing YM were 5-caffeoylquinic acid and caffeic acid. The baking process did not adversely affect the abundance of phenolic compounds. The bread-making process positively affected the phenolic profile due to the release of bound phenolic compounds. At the same time, the addition of YM as a natural ingredient promoted an increase in the polyphenols in the bread.

1. Introduction

The addition of natural ingredients in food products has become more frequent nowadays since consumers are increasingly aware of their benefits. In general, natural ingredients are chosen according to their phytochemical composition.

Ilex paraguariensis A. St. Hil., a native plant of the subtropical region of South America, is widely consumed in several countries, mainly as a hot or cold tea known as yerba mate (YM). It is also added to different food products as a natural antioxidant (Mateos, Baeza, Sarriá, & Bravo,

2018; Cheminet, Baroni, & Wunderlin, 2021) since the leaves have well-known pharmacological properties, including anti-inflammatory and antitumoral bioactivity (Bracesco, Sanchez, Contreras, Menini, & Gugliucci, 2011; Gan, Zhang, Wang, & Corke, 2018). These properties are associated with a high content of phenolic compounds (Santetti et al., 2021a). Some phenolic compounds in yerba mate, such as 5-caffeoylquinic acid, rutin, isoquercetin and caffeic acid, can increase the functionality of food products due to their biological activity (Mateos et al., 2018).

Phenolic compounds from different plant sources have been

* Corresponding author.

E-mail addresses: cameron@unirio.br (L. Claudio Cameron), mariana.ferreira@unirio.br (M. Simões Larraz Ferreira), renata.amboni@ufsc.br (R. Dias de Mello Castanho Amboni).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111635>

Received 26 April 2022; Received in revised form 29 June 2022; Accepted 5 July 2022

Available online 8 July 2022

0963-9969/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANEXO D – Trabalhos apresentados em eventos



XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

O Uso Consciente da Biodiversidade: Perspectivas para o Avanço da Ciência e Tecnologia de Alimentos

13 a 16 de Agosto de 2018 - Belém, Pará, Brasil

CERTIFICADO



Certificamos que o trabalho científico,

3824 - EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE ERVA-MATE NAS PROPRIEDADES REOLÓGICAS E QUÍMICAS DE MASSA DE FARINHA INTEGRAL DE TRIGO foi apresentado na forma de apresentação **E-POSTER** no **XXVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, realizado no Hangar Centro de Convenções em Belém do Pará, no período de 13 a 16 de agosto de 2018, tendo como autores: **GABRIELA SOSTER SANTETTI, BHEATRIZ SILVA MORAIS DE FREITAS; LETÍCIA MARIANE DELOSS GÜLLICH; TATIANA ORO; LUIZ CARLOS GUTKOSKI; RENATA DIAS DE MELLO CASTANHO AMBONI.**

Belém, Pará 16 de agosto de 2018.



Professora Dr^a. Luiza Helena Meller de Silva
Presidente do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos



Professora Dr^a. Lucia de Fatima Henriques Loureiro
Coordenação de Trabalhos Científicos do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Promoção:



Realização:



Patrocínio:



Organização:





XXI ENCONTRO NACIONAL E VII CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS
CADEIA PRODUTIVA E SEGURANÇA ALIMENTAR: DESAFIOS E ESTRATÉGIAS
26 A 30 DE MAIO DE 2019
CENTRO DE CONVENÇÕES CENTRO SUL (FLORIANÓPOLIS/SC) - BRASIL

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **PROPRIEDADES DE PASTA DE FARINHA DE TRIGO INTEGRAL ELABORADA PELA INCORPORAÇÃO DE ERVA-MATE EM DIFERENTES GRANULOMETRIAS** de autoria de **GABRIELA SOSTER SANTETTI; ANA CAROLINA MATTANA SILVA; BHEATRIZ SILVA MORAIS DE FREITAS; JÚLIA DOS SANTOS OPUSKI DE ALMEIDA; MICHELLY PONTES TAVARES VIEIRA; JOSEANE BRESSIANI; LUIZ CARLOS GUTKOSKI; RENATA DIAS DE MELLO CASTANHO AMBONI** foi apresentado, durante o **XXI Encontro Nacional e VII Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos**, realizado de 26 a 30 de maio de 2019, no Centro de Convenções CentroSul, em Florianópolis/SC - Brasil.

Florianópolis, 30 de maio de 2019.



Everildo Queiroz de Campos Jr.
Presidente Nacional Brasileiro de Analistas de Alimentos - SBAAAL



Eliane Bressa Dalton
Presidente do VII SBAAAL e VII Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos

















I Simpósio de Integração e Internacionalização das Pós-Graduações do CCA-UFSC
 "Produção sustentável de alimentos no âmbito das Ciências Agrárias"
 15 a 17 de outubro de 2019
 Florianópolis/SC

Certificado

Certificamos que o trabalho "**ANTIOXIDANT CAPACITY OF BREAD ENRICHED WITH YERBA MATE LEAVES IN WHOLE WHEAT FLOUR**", sob autoria de Gabriela S. Santetti, Marina V. Dacoreggio, Heloisa P. Inácio, Barbara Biduski, Luiz C. Gutkoski E Renata M. D. C. Amboni, foi apresentado por **GABRIELA SOSTER SANTETTI**, na forma de Pôster Digital, durante o 1º Simpósio de Integração e Internacionalização das Pós-Graduações do CCA-SInPós, promovido pelos Programas de Pós-Graduação do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, no período de 15 a 17 de outubro de 2019.

Realização



Leila Hayashi

Profa. Dra. Leila Hayashi
 Presidente do I SInPós

Apoio



13 SLACA

Simpósio Latino Americano
 de Ciência de Alimentos
 O FUTURO DOS ALIMENTOS

Certificado

10 a 12 de Novembro de 2019

Certificamos que o trabalho intitulado

YERBA MATE PARTICLE SIZE INFLUENCE ON PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

de autoria de

Gabriela Soster Santetti, Júlia Pedó Gutkoski, Bárbara Biduski, Luiz Carlos Gutkoski, Renata Dias de Mello Castanho Amboni

foi apresentado na categoria Oral no 13º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: "O Futuro do Alimento", realizado de 10 a 12 de novembro de 2019, Campinas - São Paulo - Brasil.

Mário Roberto Maróstica Jr

Dr. Mário Roberto Maróstica Jr
 Coordenador do Comitê de Programação

Juliano Lemos Bicas

Dr. Juliano Lemos Bicas
 Coordenador do Comitê Científico

Glaucia Maria Pastore

Dra. Gláucia Maria Pastore
 Presidente do Evento



Certification by Galeá





CERTIFICATE OF POSTER PRESENTATION

We certificate that the poster titled

YERBA MATE AS FUNCTIONAL COMPONENT: ELABORATION OF A WHOLE
WHEAT BREAD AND THE IMPACT ON ANTIOXIDANT ACTIVITY

authored by

Gabriela S. Santetti, Marina V. Dacoreggio, Heloísa P. Inácio, Barbara Biduski,
Luiz C. Gutkoski, Renata M. D. C. Amboni

was presented in the 3rd Workshop on Bioactive Compounds & Food Quality (16 hours),
that was held by the Federal University of Santa Maria (Brazil), on July 27-30, 2021.
The abstract was published in the Annals of the event (ISSN number 2525-9873).

Prof. Dr. Tatiana Emanuelli
Chair of the Organizing Committee

