



## Controle de qualidade microbiológico e avaliação da eficácia de conservante em bebida energética a base de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)

Microbiological analysis and challenge test in an energy drink based on extracts of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)

Recebido em 12/01/2012

Aceito em 06/06/2012

Mariana Somensi Gomes<sup>1</sup>, Laís Ramos Floriani<sup>1</sup> & Fábio Seigi Murakami<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Curso de Farmácia, Universidade Positivo, Curitiba, PR, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil

### RESUMO

A qualidade dos produtos disponíveis para o consumo é de extrema importância para garantir a segurança alimentar. A presença de microrganismos patogênicos, aliada as práticas inadequadas de processamento, armazenamento e falta de higiene durante a preparação, podem alterar as características sensoriais, resultando em deterioração e toxinfecções alimentares, constituindo potencial risco a saúde pública. Neste trabalho foi realizado o controle de qualidade microbiológico, estudo preliminar de estabilidade e o teste desafio de conservante em uma bebida energética a base de extrato de erva-mate. O produto não apresentou contaminação microbiana, tanto no controle inicial como após 30 dias aberto. No teste desafio, observou-se que após 7 dias todos os microrganismos foram destruídos, exceto o bolor *Aspergillus niger* que continuou viável após redução significativa da carga inicial de inóculo. Observando os resultados o produto foi aprovado no teste desafio e encontrou-se dentro dos critérios preconizados pela Farmacopéia brasileira 5ª. edição (2010). A partir dos resultados obtidos nesse estudo pôde-se constatar que a bebida energética a base de extrato de erva-mate encontra-se dentro dos parâmetros de qualidade, segurança e condições higiênico-sanitárias.

**Palavras-chave:** Análises microbiológicas, Teste desafio, Energético, *Ilex paraguariensis* St. Hil.

### ABSTRACT

The quality of the products available for consuming is one of the most import criteria to ensure food safety. The presence of pathogenic microorganisms, along with inadequate processing practices, storage and poor hygiene during preparation, can alter the sensory characteristics, resulting in spoilage and food poisoning, leading to a potential hazard to the public health. In this paper, microbiological quality control, the preliminary study of stability, and the microbiological challenge testing of yerba mate extract based energy drink were performed. The product showed no microbial contamination in both the initial control and after 30 days exposure to an open environment. At the challenge test, it was observed that after 7 days, all microorganisms were destroyed except the mold *Aspergillus niger*, which remained viable after a significant reduction at the initial inoculum load. The results show that the product passed the challenge test and stands whitin the criteria established by the Brazilian Pharmacopoeia 5th. edition (2010). From the results obtained in this study, it is possible to state that the energy drink based on extracts of yerba mate meets the parameters of quality, safety, and sanitary conditions.

**Keywords:** Microbiological analysis, Challenge test, Energy drink, Yerba mate.

### INTRODUÇÃO

A erva-mate, pertencente à família das Aquifoliaceae e gênero *Ilex*, deve sua classificação botânica ao naturalista francês Auguste de Saint-Hilaire que, em uma viagem feita ao Brasil em 1822, coletou amostras que foram encaminhadas a Academia de Ciências do Instituto da

França, onde foi registrada como *Ilex paraguariensis*. Tem sua origem na América do Sul e ocorre naturalmente na Argentina, Brasil e Paraguai. No Brasil existem cerca de 60 espécies do gênero *Ilex*, cada uma delas com diferentes variedades. A *Ilex paraguariensis* apresenta ligeiras dife-

\* Contato: Fábio Seigi Murakami, Departamento de Farmácia - Universidade Federal do Paraná, Av. Prof. Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico, 80210-170, Curitiba, PR, Brasil, +55 (41) 3360-4091, E-mail: fsmurakami@gmail.com

renças, como o formato ou tamanho das folhas e o tamanho do talo. A folha, parte da planta mais estudada e utilizada em desenvolvimento de produtos, apresenta coloração verde escura, possui característica alternada e mostra-se estreita na base e ligeiramente obtusa no vértice. A erva legítima tem o caule acinzentado, com diâmetro médio de 30 cm com porte variado podendo chegar a 12 metros de altura. É considerado um produto característico dos estados do Sul do Brasil, sendo consumida sob a forma de chimarrão pelo público cativo dessa área (Maccari & Santos, 2000; Rocha Jr & Miloca, 2007; Karak, Bhagat, 2010).

A alta variedade de compostos químicos presentes nas folhas da erva-mate tem sido foco de muitas pesquisas. De acordo com Bracesco e colaboradores (2011), nos últimos 15 anos a literatura relata muitos estudos da *Ilex paraguariensis* mostrando seus efeitos como, por exemplo: propriedades antioxidantes, estimulantes, vasodilatadoras, redução de colesterol, efeitos antimutagênicos e propriedades de redução de peso, e etc.

A indústria tem demonstrado grande interesse na sua utilização, não somente para comercialização de bebidas, mas também no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, cosméticos e de higiene. Dentre esses compostos já relatados para a espécie *illex*, pode-se destacar a presença de vitaminas, minerais, saponinas, ácido fólico, metilxantinas, taninos, carotenóides, entre outros metabólitos secundários (Gnoatto *et al.*, 2008; Pagliosa, 2009; Bracesco *et al.*, 2011).

O mercado brasileiro foi invadido por bebidas ditas energéticas a partir de 1996 e esse produto possui a principal função de estimular o organismo e não de fornecer energia. A partir da década de 80 os padrões de qualidade vêm se tornando cada vez mais necessários. Atualmente a adoção de medidas efetivas vem sendo cada vez mais indispensável para aumentar a qualidade e a segurança dos alimentos, como a utilização de conservantes antimicrobianos que são substâncias adicionadas aos produtos com a finalidade de protegê-los de quaisquer crescimentos microbianos (Perone *et al.*, 2006; Mello & Silva, 2009).

Efeitos decorrentes do crescimento microbiano em produtos podem ser citados como a descoloração, formação de odores e gases, alterações nas propriedades reológicas dos compostos, e a instabilização. A evidência visual do crescimento superficial de um fungo pode ser a situação mais desconcertante para um consumidor que tem adquirido um produto. Nem sempre o produto contaminado apresenta dano visível, o que dificulta a distinção de um produto em boas condições de um contaminado (Pinto *et al.*, 2000).

A qualidade dos produtos disponíveis para o consumo é de extrema importância para garantir a segurança alimentar. A presença de microrganismos patogênicos, aliada as práticas inadequadas de processamento, armazenamento e falta de higiene durante a preparação, podem alterar as características sensoriais e resultar em deterioração e toxinfecções alimentares, constituindo potencial risco a saúde pública (Souza *et al.*, 2005; Okura *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005).

Há, portanto, duas principais razões para controlar o

número e o tipo de microrganismo. A primeira é proteger o consumidor de qualquer dano à saúde, decorrente do uso de preparações contendo microrganismos contaminantes, enquanto a segunda é proteger o próprio produto, embora não menos importante seja a preservação da reputação da empresa que o fabrica (Pinto *et al.*, 2000).

Dentro deste contexto, o presente trabalho tem como principal objetivo realizar o controle de qualidade microbiológico e avaliar a eficácia de conservantes em uma bebida energética a base de extrato de erva-mate.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram analisadas amostras de uma bebida energética à base de erva-mate. Trata-se de uma bebida inovadora de propriedade intelectual, registrada sob no. PI0802975-0A2, da INDÚSTRIA MATE LARANJEIRAS LTDA, situada na cidade de Cascavel - PR. O produto utiliza-se de conservante o benzoato de sódio e se apresenta em embalagem pet de 510 mL.

As metodologias empregadas para os ensaios microbiológicos foram baseados no Compendium of methods for the microbiological examination of foods 4<sup>a</sup> Ed (Downes & Ito, 2001).

### 2.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Todos os materiais utilizados para o processamento das amostras foram previamente esterilizados. Os procedimentos microbiológicos foram realizados em fluxo laminar desinfetado de acordo com procedimentos padrões, utilizando etanol a 70 % (v/v).

A preparação da amostra envolveu duas etapas, a homogeneização do conteúdo na qual a embalagem comercial foi invertida 25 vezes, e seguidas de diluições seriadas realizada através da transferência asséptica de 1 mL da amostra para 9 mL de água salina peptonada (Merck®) ( $10^{-1}$  até a  $10^{-3}$ ). As análises microbiológicas foram realizadas em duplicata.

#### 2.1.1 Contagem de Bactérias Viáveis Totais

A contagem padrão em placas foi realizada através da técnica de semeadura em profundidade. Para tanto, foram inoculados 1 mL de cada diluição previamente selecionada em placas de Petri estéreis e adicionado 15 mL de Ágar Padrão para Contagem (Oxoid®) previamente fundido e resfriado a 44-46 °C. A amostra foi misturada com o meio de cultura em movimento em forma de oito. As placas foram incubadas, após a completa solidificação do meio de cultura, a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $48 \pm 2$  horas. Para a contagem foi utilizado um contador de colônias e foram selecionadas as placas com 25 a 250 colônias.

#### 2.1.2 Contagem Total de Bolores e Leveduras

Foram transferidos 0,1 mL de cada diluição para placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (Merck®), acidificado, e o inóculo foi espalhado com auxílio da alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 5 dias e realizou-se a contagem as unidades formadoras de colônias utilizando o critério de 10 a 100 colônias.

#### 2.1.3 Contagem de Coliformes Totais e Termotole-

## rantes

Para a análise de coliformes totais e termotolerantes utilizou-se técnica de Número Mais Provável (NMP), onde porções de 10 mL da amostra foram inoculadas em uma série de 5 tubos contendo 10 mL de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST- Merck®), em concentração dupla com tubos de Durham invertido. Os tubos foram incubados a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas e re-incubados até completar  $48 \pm 2$  horas e com conseqüente repetição da leitura.

### 2.1.4 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Foram adicionados 25 mL de amostra em 225 mL de caldo Lethen (Merck®) e pré-incubado em estufa a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 2$  horas, em seguida foram transferidas alíquotas de 1 mL para tubos contendo Caldo de Tetrionato (TT) (Oxoid®) e Rappaport (Oxoid®) e incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 2$  horas. Após enriquecimento seletivo foram estriados em placas com Ágar Entérico de Hectoen (HE) (Merck®), Ágar Xilose Lisina (XLD) (Oxoid®) e Ágar Verde Brilhante (VB) (Oxoid®) e incubados a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas.

### 2.1.5 Contagem de *Staphylococcus aureus*

A inoculação de 0,1 mL foi feita através das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  na superfície de placas contendo Ágar Baird-Parker (Merck®). A amostra foi espalhada com auxílio de uma alça de Drigalsky e incubada a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $48 \pm 2$  horas. As placas selecionadas para contagem foram com 25 a 250 colônias.

### 2.1.6 Contagem de Enterobactérias

Inoculou-se 1 mL das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  em placas de Petri estéreis e vazias e adicionados 15 mL de Ágar Vermelho Violeta Bile com Glicose (VRBG) (Oxoid®), previamente fundido e resfriado a  $44-46^\circ\text{C}$ . As placas foram incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 2$  horas.

## 2.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO CONSERVANTE (TESTE DESAFIO)

A metodologia aplicada para avaliação da eficácia do conservante foi adaptado da Farmacopéia brasileira 5ª edição (2010). Os microrganismos empregados no teste desafio foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus niger* CCD AA001.

A partir das cepas ATCC foi realizada a padronização do inóculo na concentração de  $10^8$  UFC/mL. As culturas jovens de cada microrganismo foram diluídas em 5 mL de salina (Merck®) estéril e comparadas com a turbidez do tubo número 0,5 da escala de Mac Farland.

Transferiu-se 10 mL do produto para frascos com tampa previamente esterilizados, e contaminados propositalmente com cada microrganismo (200 microlitros de cada cepa). As amostras inoculadas foram incubadas em estufa entre  $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ , por um período de 0, 7, 14 e 28 dias. Foram realizadas diluições em água peptonada a partir de cada frasco (5 frascos, um de cada microrganismo) de  $10^{-2}$  até  $10^{-8}$ , com a finalidade de inativar o conservante.

Em cada tempo pré-estabelecido realizou-se a contagem em placas, feita em duplicata, utilizando 1 mL de cada

diluição em placas de Petri estéreis e vazias e adicionados 15 mL de Ágar Padrão para Contagem (Oxoid®) para bactérias e Ágar batata dextrose (Merck®) para bolores e leveduras, previamente fundidos e resfriados a  $44-46^\circ\text{C}$ . As placas de bactérias foram incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas e as de fungos foram incubadas a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 5 dias. As unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas com auxílio de um contador de colônias manual.

## 2.3 ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA

Após manter o produto aberto, armazenado à temperatura ambiente durante 30 dias foram realizado novamente as análises microbiológicas, com a finalidade de assegurar que o produto mesmo após aberto, preservou suas características. Os ensaios realizados neste estudo estão descritos no item 2.1.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

O controle de qualidade faz parte das boas práticas de fabricação (BPF) referente à amostragem, especificações, ensaios, procedimentos e documentação, além disso, deve estar envolvido em todas as decisões relacionadas à qualidade do produto, não se limitando apenas às operações laboratoriais. O controle microbiológico de um alimento é muito importante, pois além de determinar através de indicadores microbianos as condições higiênicas e sanitárias das várias etapas do processamento do produto alimentício, evita a presença de agentes de toxinfecção alimentar (Perone, *et al.*, 2006; Gil, 2010).

Nesse trabalho foi realizada a avaliação microbiológica de uma bebida energética à base de erva mate. Os resultados obtidos estão representados na tabela 1.

Tabela 1. Resultados obtidos para a análise microbiológica da bebida energética

Análise Microbiológica	Resultados	Resultados após 30 dias
Bolores e leveduras	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL
Bactérias viáveis totais	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL
Coliformes Totais e Termotolerantes	< 2,2 NMP/mL	< 2,2 NMP/mL
Enterobactérias	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL
<i>S. aureus</i>	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL
<i>Salmonella</i>	Ausência/ 25 mL	Ausência/ 25 mL

Segundo a RDC 12 de 2001 (ANVISA/MS), o produto analisado, bebida energética, enquadra-se no critério de outros compostos líquidos prontos para o consumo adicionados de conservante, onde é preconizada apenas a ausência de Coliformes Totais e Termotolerantes.

Além desse parâmetro, a fim de verificar as condições de qualidade microbiológica do produto, foram realizadas análises adicionais como a contagem de bactérias viáveis totais, contagem de bolores e leveduras, contagem de Enterobactérias, contagem de *S. aureus* e pesquisa de *Salmonella*.

De acordo com os resultados obtidos pode-se considerar que o produto está dentro dos parâmetros de qualidade microbiológica, tanto no controle inicial quanto após 30 dias aberto.

Na análise para contagem de bactérias viáveis totais e bolores e leveduras os resultados encontrados foram menores que 10 UFC/mL, estes valores refletem as condições de qualidade do produto. Essa contagem é necessária para indicar a deterioração do alimento e verificar se as normas de higiene durante a manipulação e armazenamento do produto estão sendo respeitadas. A presença de bolores e leveduras em níveis elevados causa mudanças indesejáveis, tanto na composição química quanto na aparência, dessa forma, o produto passa a ser rejeitado.

Devido ao não crescimento de coliformes totais e termotolerantes, enterobactérias e *S. aureus*, pode-se assegurar que a bebida apresenta boas condições higiênico-sanitárias, o que indica que foi fabricado dentro das normas de Boas Práticas de Fabricação.

A análise microbiológica para pesquisa de *Salmonella* spp. demonstrou também a ausência dessa bactéria, assim os resultados evidenciam que o produto está sem potencial risco para a saúde do consumidor, uma vez que todas as cepas de *Salmonella* são consideradas patogênicas ao homem.

O estudo preliminar de estabilidade microbiológica foi realizado com o objetivo de avaliar as condições de armazenamento após 30 dias da abertura do produto. Os valores obtidos demonstram que a bebida energética a base de extrato de erva-mate preservou suas características microbiológicas iniciais, resultados estes observados pelo não desenvolvimento de microrganismos conforme apresentado na tabela 1.

O produto mostrou-se com um ótimo padrão de qualidade, pois mesmo após ser exposto a condições normais de armazenamento por 30 dias, preservou suas características microbiológicas iniciais.

### 3.2 TESTE DESAFIO

O teste desafio tem como objetivo avaliar a eficácia do sistema conservante necessário à proteção satisfatória do produto, desde a fabricação até o prazo final de validade. Isto não significa que é uma simulação de uma situação real, e não garante que um sistema conservante que passe no teste nunca permitirá o crescimento de microrganismos no produto (Sutton & Porter, 2002; Associação Brasileira de Cosmetologia, 2008).

Os resultados do teste do desafio da bebida energética a base de erva-mate com os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger* podem ser observados na Tabela 2.

A padronização do inóculo foi realizada a partir da escala nefelométrica 0,5 de Mac Farland a qual preconiza uma concentração de  $10^8$  UFC/mL. Sendo assim, depois de padronizada com a turbidez do tubo número 0,5 da escala realizou-se a contagem padrão em placas a fim de verificar se a densidade de carga microbiana estava dentro do preconizado. Os resultados obtidos para todos os microrganismos foram na faixa entre  $10^7$  -  $10^8$  UFC/mL.

Analisando os resultados verifica-se que no tempo zero a contagem de microrganismos foi na ordem de  $10^7$  -  $10^8$  UFC/mL, isto é o desejável em um teste desafio, pois desta forma verifica-se a quantidade inicial de inóculo adicionada.

Tabela 2. Contagem de sobreviventes do teste desafio

Tempo (dias)	Microrganismos				
	<i>C. albicans</i> (UFC/mL)	<i>S. aureus</i> (UFC/mL)	<i>E. coli</i> (UFC/mL)	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL)	<i>A. niger</i> (UFC/mL)
0	$1 \times 10^3$	$8,2 \times 10^7$	$8,8 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	$1 \times 10^7$
7	<10	<10	<10	<10	$15 \times 10^2$
14	<10	<10	<10	<10	$5 \times 10^2$
28	<10	<10	<10	<10	$6 \times 10$

No tempo zero o contato entre o microrganismo e o conservante presente na formulação é muito rápido, não permitindo que ocorra uma diminuição da carga microbiana.

De acordo a Farmacopéia brasileira 5ª edição (2010), nos critérios para eficácia antimicrobiana, onde a bebida enquadra-se na categoria 3 (produtos orais constituídos de base ou veículo aquoso), afirma-se que para bactérias no 14º dia deve haver redução de 1 log no número de UFC inicialmente inoculados e no 28º dia a contagem não deve aumentar em relação ao 14º dia.

Já para bolores e leveduras não deve haver aumento no número de UFC inicialmente inoculados. Nos estudos realizados, a partir da análise de 7 dias já se observa uma redução de mais de 90 % de todos os microrganismos testados, exceto o bolor *A. niger*, que continuou viável até 28 dias após a inoculação. Houve redução da carga microbiana deste de  $1 \times 10^7$  UFC/mL para  $6 \times 10$  UFC/mL.

O resultado obtido no teste desafio permite sugerir que a quantidade de substâncias antimicrobianas presentes na formulação não destruiu todos os esporos da cepa de bolor (*Aspergillus niger*), como já é conhecido conídios são mais resistentes do que o micélio vegetativo, sendo assim a provável resposta para a sua sobrevivência neste teste (Trabulsi & Alterhum, 2005).

De fato, pode-se sugerir que nesse caso, o conservante (benzoato de sódio) presente na formulação da bebida energética apresentou ação fungistática e não fungicida como o esperado. Porém, observando os resultados, o produto foi aprovado no teste desafio, pois se encontrou dentro dos critérios preconizados pela Farmacopéia brasileira 5ª. edição (2010).

O benzoato de sódio é um pó cristalino estável, de sabor suave e adstringente, com alta solubilidade em água fria, sendo que não interfere na coloração dos alimentos. Os benzoatos e seus sais são eficazes na faixa de pH 2,5 - 4,0, sendo assim é muito eficiente no controle de leveduras. Trata-se de agentes muito efetivos e foram os primeiros conservantes permitidos pelo FDA, e em função do seu baixo custo, são os antimicrobianos mais empregados na indústria alimentícia e farmacêutica (Trinderup *et al.*, 2011).

### CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse estudo pôde-se

constatar que a bebida energética a base de extrato de erva-mate encontra-se dentro dos parâmetros de qualidade, segurança e condições higiênico-sanitárias. Os valores obtidos no estudo preliminar de estabilidade microbiológica asseguram as propriedades antimicrobianas presentes no conservante, observadas no teste desafio, o qual se mostrou eficaz com os microrganismos *S.aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *A. niger*, este mesmo com uma diminuição considerável em sua contagem, apresentou-se viável até 28 dias após a inoculação, ainda assim encontra-se dentro dos critérios da Farmacopéia brasileira 5ª. edição (2010).

## REFERÊNCIAS

Associação brasileira de cosmetologia. Guia ABC de microbiologia. 3ª ed. São Paulo: Pharmabooks, 2008. 59 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 de 02 de janeiro de 2001.

Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 136, p. 378-384, 2011.

Downes FP & Ito K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4ª ed. Washington: American Public Health Association, 2001.

Farmacopéia brasileira. 5ª ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2010.

Gil ES. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. 3ª ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

Gnoatto SC, Dassonville-klimpt A, Nascimento S, Galéra P, Boumediene K, Gosmann G, Sonnet P, Moslemi S. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. *Eur. J. Med. Chem.* 1865-1877, 2008.

Karak T, Bhagat RM. Traces elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. *Food Research International*, v. 43, p. 2234-2252, 2010

Maccari AJ & Santos APR. Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate. 1ª ed. Curitiba: Editora do autor, 2000.

Mello VF & Silva AT. Impacto da aplicação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle em indústria de bebidas orgânicas. *Rev. Hig. Alimentar* 174/175: 42-46, 2009.

Okura MH, Janini AE, Oliveira GB, Pereira KS, Borges L, Ferreira MGN. A contaminação em salgados (coxinhas) encontrados no centro da cidade de Uberaba, MG. *Rev. Hig. Alimentar* (19): 65-68, 2005.

Oliveira, SP, Freitas FV, Muniz LB, Prazeres R. Condições higiênico sanitárias do comércio de alimentos no município de Ouro Preto, MG. *Rev. Hig. Alimentar* (19): 26-31, 2005.

Pagliosa CM. *Caracterização química do resíduo de ervais e folhas "in natura" de erva-mate (Ilex paraguariensis A. St. Hil.)*. 2009. 143 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

Perone, CAS, Moreira MEM, Torres MA, Borges GA, Milward TEBM, Pontes LF. Bebidas energéticas: componentes e custo-benefício. *Rev. Hig. Alimentar* (20): 24-28, 2006.

Pinto TJA, Kaneco TM, Ohara MT. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. 212 p.

Rocha Júnior WF, Miloca LM. Sistema Agroindustrial Ervateiro: perspectivas e debates. Cascavel: Coluna do Saber, 2007. 206 p.

Souza DL, Silvério FL, Oliveira TS, Bianchi MC, Gollucke APB. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase-positiva* em doces recheados vendidos em feiras-livres. *Rev. Hig. Alimentar* 132 (19): 49-57, 2005.

Sutton VW & Porter, D. Development of the antimicrobial effectiveness test as USP chapter. *J. Pharm. Sc. Tech.* n.6, 2002. 301-311 p.

Trabulsi, LR & Alterhum F. Microbiologia. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005.

Trinderup R A, Carità E, Faria de Almeida AL, Brito E. Conservantes. *Food ingredients brasil*, n.18, p. 29-51, 2011.

Urban T. O livro do matte. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Mergulhar, 1990. 12 – 33 p.