

## Área: Tecnologia de alimentos

# OBTENÇÃO DE EXTRATO DE ERVA MATE E ELABORAÇÃO DE EMBALAGEM ATIVA

Mateus A. Knapp<sup>1</sup>, Daniella P. Riccio<sup>2</sup>, David F. dos Santos<sup>1</sup>, Vânia Z. Pinto<sup>1,2\*</sup>

*1 Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul, PR*

*2 Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – PPGCTAL, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul, PR. \*E-mail: vania.pinto@uffs.edu.br*

**RESUMO** – A erva mate é um produto regional, obtida através das folhas da árvore de erva mate e possui diversos compostos de interesse alimentar, tais como, compostos fenólicos, antimicrobianos e antioxidantes naturais. Desta forma, objetivou-se avaliar diferentes solventes para obter extrato de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) e utiliza-lo como componente ativo para elaborar filmes biodegradáveis ativos com posterior caracterização dos mesmos. Os extratos de erva mate foram preparados utilizando água(100%), água:etanol (50:50 v/v) e etanol (100%) e depois caracterizados quanto à densidade, teor de clorofilas ‘a’, ‘b’ e totais, carotenoides totais, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro*. Nos filmes (controle e contendo 10% de extrato de erva mate) foram avaliadas a cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), opacidade, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro*. Os extratos de erva mate apresentaram concentrações intermediárias de compostos fenólicos e atividade antioxidante pela inibição do radical DPPH•. Os filmes elaborados com extrato de erva mate apresentaram características visuais muito semelhantes ao filme controle, com homogeneidade e certa maleabilidade. Além disso, os filmes apresentaram aumento na opacidade quando adicionados de extrato de erva mate. O teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos filmes foram superiores ao filme controle (sem extrato) comprovando a obtenção de filmes com propriedades de embalagens ativas. As aplicações para este tipo de embalagem são inúmeras, como por exemplo, a aplicação em alimentos com teor considerável de lipídios.

**Palavras-chave:** *Ilex paraguariensis* St. Hil, compostos fenólicos, atividade antioxidante.

## 1 INTRODUÇÃO

A erva mate é um produto regional, obtida através das folhas da árvore de erva mate que pertence à família *Aquifoliaceae* e possui diversos compostos de interesse alimentar, tais como, compostos fenólicos, antimicrobianos e antioxidantes naturais (MACCARI e MAZUCHOWSKI, 2000). O Paraná tem destaque na produção brasileira da erva mate com um total de 70% da participação de mercado nacional. Além disso, a erva mate é de grande relevância econômica, atingindo no cenário nacional, aproximadamente 596 municípios, envolvendo 180 mil propriedades rurais e mais de 710 mil trabalhadores diretos (RODIGHERI et al., 2005).

Vários constituintes podem ser encontrados na planta, entre eles, xantinas, saponinas, compostos fenólicos, derivados do cafeiolo e flavonóides (BURRIS et al, 2012). Além disso, concentração de derivados de

cafeoil, tais como, os ácidos clorogênicos e o ácido caféico, e também os derivados de flavonóides, como a rutina e a quercetina (FILIP et al 2001) são elevadas. Alguns destes compostos possuem atividade antioxidante e antimicrobiana frente à bactérias, fungos e vírus, como é o caso do ácido cafeico juntamente com os flavonóides (CUSHNIE, LAMB, 2005; COWAN, 1999). A pesquisa com antioxidantes naturais é uma tendência atual e o uso dos mesmos em embalagens ativas pode ampliar a vida útil dos alimentos, bem como da própria embalagem (ARCAN, 2011).

Algumas características devem ser levadas em consideração para considerar uma embalagem apta para aplicação em alimentos, as quais são, qualidades sensoriais, boas propriedades de barreiras, propriedades mecânicas, estabilidade microbiológica, físico-químicas e bioquímica, baixa toxicidade, baixo custo e não poluente (DEBEAUFORT et al, 1998). Assim, as características dos filmes empregados no processamento de alimentos são determinantes para a sua aplicação.

Desta forma, objetivou-se avaliar diferentes solventes para obter extrato de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) e utiliza-lo como componente ativo para elaborar filmes biodegradáveis ativos com posterior caracterização dos mesmos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

As folhas de erva mate foram coletadas no município de Laranjeiras do Sul – PR, em área não nativa. Estas foram selecionadas, higienizadas com hipoclorito de sódio (100 ppm, por 10 minutos) e água corrente, secas em estufa com circulação de ar (72 h a 35 °C). Na sequência, foram moídas em moinho de facas tipo Willye (Fortinox, Star FT-50, Brasil) com granulometria de 20 mesh e armazenadas em freezer a -18°C acondicionadas em sacos de nylon sob vácuo até a sua utilização. O amido de mandioca utilizado para a elaboração dos filmes foi adquirido no mercado local e os reagentes utilizados foram de grau analítico (PA).

Os extratos foram preparados em triplicatas utilizando solventes específicos (água, etanol e 50 % água com 50 % etanol (Água/Etanol)) contendo 20% (m/v) de erva mate moída em relação ao respectivo solvente. Os erlenmeyers foram mantidos sob agitação branda constante durante 5 h a 50 °C. Após este período, os extratos foram filtrados utilizando papel filtro e o volume final foi ajustado após a filtração. O filtrado foi armazenado em frasco âmbar até o momento das análises, sob refrigeração (4 °C).

A densidade foi determinada utilizando proveta e balança analítica, medindo-se o volume de extrato e sua respectiva massa, calculando assim a densidade pela Equação 1.

$$\text{Densidade (g L}^{-1}\text{)} = \text{massa (g)/volume (L)} \quad (\text{Equação 1})$$

Para a determinação do teor de clorofilas totais e carotenóides totais, a absorbância (A) dos extratos foi obtida por espectrofotometria a 647, 663 e 470nm. Os teores de clorofilas totais, 'a', 'b' e de carotenóides totais foram calculados através de Equações 2, 3, 4 e 5 estabelecidas por Lichtenthaler (1987), os resultados foram expressos em  $\mu\text{g.g}^{-1}$ .

$$\text{Chl totais} = 7,15 (A_{663}) + 18,71 (A_{647}) \quad (\text{Equação 2})$$

$$\text{Chl 'a'} = 12,25 (A_{663}) - 2,79 (A_{647}) \quad (\text{Equação 3})$$

$$\text{Chl 'b'} = 21,50 (A_{647}) - 5,10 (A_{663}) \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{Carotenoides} = (1000 (A_{470}) - 1,82 \text{ Chl 'a'} - 85,02 \text{ Chl 'b'})/198 \quad (\text{Equação 5})$$

Para determinação dos fenóis totais foi utilizado o reativo Folin-Ciocalteu, com leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan GO, Estados Unidos) em 750nm (MEDA et al., 2005). A análise foi realizada em triplicata e o resultado foi expresso em mg equivalente de ácido gálico (EAG) por g de extrato.

A atividade antioxidante (AA) *in vitro* dos extratos foi realizada através do método de inibição do radical DPPH• de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset, (1995). Diluiu-se o radical DPPH• em metanol (0,06 mM), e foi feita uma primeira diluição para os extratos de erva mate, diluindo-se 50 µL e completando para 5 mL e após transferiu-se microplacas 7 µL desta diluição, adicionando-se então 273 µL do radical DPPH• e realizou-se a leitura, em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan GO, Estados Unidos) a 515nm, a cada 10 minutos até não haver alteração na absorbância da amostra. Os resultados foram calculados em porcentagem de atividade antioxidante (Equação 6). Sendo que, Abs<sub>controle</sub> = Absorbância da solução de DPPH• 0,06mM; Abs<sub>amostra</sub> = Absorbância da amostra.

$$AA (\% \text{ Inibição}) = ((\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{controle}}) * 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Para a elaboração dos filmes ativos, utilizou-se amido de mandioca comercial, juntamente com plastificante (glicerol) e extrato de erva mate (10%). Utilizou-se 3,5 g de amido, 1,05 g de glicerol, 10 mL de extrato e 90 mL de água que foram misturados e aquecidos em banho-maria à 85°C ± 2°C para promover a gelatinização do amido. Uma formulação sem extrato de erva mate foi empregada como controle. Após, pesou-se 20g da solução formadora de filme em placas de petri descartáveis, seguidas de secagem estufa com circulação de ar (SPlabor, Modelo SP-102/64, Brasil) durante 16h a 35°C.

Para determinação de cor e opacidade do filme ativo foram realizadas quatro leituras utilizando o colorímetro (C400, Minolta, Japão), sendo uma no centro e as demais no perímetro. Os parâmetros de cor L\* (preto/branco) e as coordenadas de cromaticidade a\* (verde/vermelho) e b\*(azul/amarelo) foram determinados. Para determinação da opacidade dos filmes foi calculada a relação entre a opacidade do filme sobreposto ao padrão preto (P<sub>preto</sub>) e padrão branco (P<sub>branco</sub>).

Para análise de compostos fenólicos e atividade antioxidante através da inibição do radical DPPH• do filme ativo, a metodologia utilizando foi a mesma proposta para os extratos. A quantificação foi realizada com a solubilização de 1g de filme em solvente (50% etanol: 50% água) durante 24h, sob agitação, então os mesmos foram filtrados, determinando-se os teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos filtrados.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 podem ser observadas a densidade, o teor de clorofilas e de carotenoides e a concentração de compostos fenólicos para os extratos de erva mate obtidos com diferentes solventes. As médias de densidade para os extratos com diferentes solventes apresentaram diferenças entre si (p<0,05), sendo que a maior densidade foi observada utilizando água como solvente. Este resultado está próximo da densidade da água pura que é, em média, 1000 g L<sup>-1</sup>, enquanto que do extrato usando etanol foi 794,74±42,92 g L<sup>-1</sup>. Para o solvente água/etanol a densidade foi de 919,06 ±40,81 g L<sup>-1</sup>, isto devido à mistura conter menor concentração de etanol que água. Este comportamento é resultado da evaporação do etanol durante a extração a 50 °C e posterior ajuste do volume final

com água após a filtração do extrato. Assim, pode-se concluir que o teor de sólidos apresenta pouca influência na densidade dos extratos de erva mate em relação ao solvente empregado.

Tabela 1 Densidade, teor de clorofilas, carotenoides dos extratos de erva mate obtidos com diferentes solventes

Solvente*	Densidade (g L <sup>-1</sup> )	Clorofilas (µg g <sup>-1</sup> )	Carotenoides (µg β caroteno g <sup>-1</sup> )
Água	999,44±5,81 <sup>a</sup>	2,74±0,23 <sup>c</sup>	0,31±0,06 <sup>c</sup>
Etanol/Água	919,06±40,81 <sup>b</sup>	6,08±0,26 <sup>b</sup>	2,48±0,13 <sup>a</sup>
Etanol	794,74±42,92 <sup>c</sup>	18,64±0,66 <sup>a</sup>	1,26±0,15 <sup>b</sup>

\*Médias de três determinações. Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada propriedade, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05). Água – 100% água, Etanol/Água – 50% etanol e 50% água e Etanol – 100% etanol. EAG – equivalente de ácido gálico.

Para o teor de clorofilas e carotenoides os resultados apresentaram diferenças para os três solventes utilizados (p<0,05). Na extração de clorofilas o melhor solvente foi o etanol (18,64 µg g<sup>-1</sup>), seguido do etano/água (6,08 µg g<sup>-1</sup>) e água (2,74 µg g<sup>-1</sup>). O solvente que mais extraiu carotenoides foi a mistura água/etanol, enquanto o solvente água apresentou menor concentração. Os solventes polares como a acetona, o metanol, o etanol, o acetato de etila, a piridina e a dimetilformamida são os mais eficazes para a extração completa das clorofilas (Damodaran, Parkin, Fennema 2010). A água, por apresentar característica polar, não é um bom solvente para extração de carotenoides que apresentam característica apolar. Enquanto que etanol em elevadas concentrações (100%) pode atuar degradando e reduzindo a extração dos mesmos. Isto explica o fato da extração com a mistura água/etanol ter sido mais eficiente na extração de carotenoides. Os solventes apolares são mais eficientes em extração de carotenoides, porém os mesmos podem degrada-los rapidamente, além disso, autora sugere que o etanol pode ser considerado um bom extrator de carotenoides quando se trata de xantofilas (RODRIGUES-AMAYA, 2016).

O teor de compostos fenólicos do extrato de erva mate com diferentes solventes não apresentaram diferença em suas médias (p<0,05), variando entre 6,67mg EAG g<sup>-1</sup> a 7,28mg EAG g<sup>-1</sup> (Tabela 2). A fase aquosa é eficiente para extração de algumas classes de compostos fenólicos, e por outro lado o etanol atua em outras classes. A extração de compostos fenólicos de erva mate utilizando a mistura de água e 70% de etanol, resultou em 6,01mg EAG g<sup>-1</sup> (FERNANDES et al., 2016), sendo próximo ao verificado para os diferentes solventes utilizados neste trabalho. A mistura água/etanol resultou em extratos com o dobro da atividade antioxidante que o solvente etanol e pelo menos 3,5 vezes mais que a solvente água (Tabela 2).

Tabela 2 Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante de extrato de erva mate com diferentes solventes

Solvente*	Compostos fenólicos (mg EAG g <sup>-1</sup> )	AA (% inibição DPPH•**)
Água	6,67±0,39 <sup>a</sup>	6,20±0,96 <sup>b</sup>
Etanol/Água	7,28±0,08 <sup>a</sup>	21,39±3,30 <sup>a</sup>
Etanol	7,06±0,23 <sup>a</sup>	11,18±0,22 <sup>b</sup>

\*Médias de três determinações. Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada propriedade, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey(p<0,05).Água – 100% água, Etanol/Água – 50% etanol e 50% água e Etanol – 100% etanol, AA=atividade antioxidante, \*\* 2,2-difenil-1-picril-hidrazila.

A atividade antioxidante *in vitro* está associada à presença de compostos bioativos naturalmente presentes nas folhas de erva mate, tais como, carotenoides e compostos fenólicos, cada um agindo de uma forma diferente frente aos radicais livres (PRADO et al ,2009). Esta característica é consequência do espectro de extração do solvente, que apresenta características polares e apolares.

Nos parâmetros de cor (L, a\*, b\*) observa-se que a concentração de extrato influenciou no L\* e no a\* (p<0,05), bem como na opacidade dos filmes (Tabela 3). Com a adição do extrato de erva mate nos filmes a luminosidade diminuiu, resultando em um material mais escuro e, aumentou a opacidade. Este comportamento pode ser pela concentração de pigmentos como clorofila presentes no extrato que foi adicionado nos filmes.

A concentração de compostos fenólicos nos filmes aumentou com a adição do extrato de erva mate (Tabela 4). Isto pode ser explicado devido ao teor de compostos fenólicos presente no extrato (Tabela 2). O teor de compostos fenólicos é muito importante para a finalidade proposta da embalagem, tais como, as funções ativas. A atividade antioxidante através da inibição do radical DPPH• dos filmes diferiu entre si (p<0,05), com a adição do extrato de erva mate (Tabela 4). Isto pode ser justificado devido ao aumento de compostos fenólicos presentes no extrato com o aumento da concentração dos mesmos nos filmes. Estes fenóis atuam como antioxidantes naturais e reagem com os radicais livres DPPH• inibindo a ação dos mesmos. Os estudos de Prado et al (2009) mostraram correlações de <0,93 da inibição do radical DPPH• em função da concentração de compostos fenólicos confirmando assim a correlação entre compostos fenólicos e a atividade antioxidante.

Tabela 3 – Parâmetros de cor L, a\*, b\* e opacidade dos filmes ativos

Concentração	L	a*	b*	Opacidade
Controle	75,73 <sup>a</sup>	-1,67 <sup>a</sup>	22,48 <sup>a</sup>	8,10 <sup>a</sup>
Extrato 10%	48,06 <sup>b</sup>	-3,66 <sup>b</sup>	25,03 <sup>a</sup>	9,75 <sup>b</sup>

\*Medias de três determinações. Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada propriedade, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey(p<0,05).

Sendo assim, com o aumento da concentração de compostos fenólicos, estes que, são compostos antioxidantes naturais e podem retardar a degradação de alimentos, pode promover aumento na capacidade antioxidante da embalagem quando adicionada de extrato de erva mate, tornando-a ativa. As aplicações para este tipo de embalagem são inúmeras, como por exemplo, a aplicação em alimentos com teor considerável de lipídios.

Tabela 4 Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos filmes ativos

Concentração	Compostos fenólicos (mg EAG g <sup>-1</sup> )	DPPH•**(% inibição)
Controle	0,710±0,01 <sup>a</sup>	2,08±0,20 <sup>a</sup>
Extrato 10%	1,326±0,09 <sup>b</sup>	24,48±0,12 <sup>b</sup>

\*Medias de três determinações. Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada propriedade, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey(p<0,05).

## 4 CONCLUSÃO

Os extratos de erva mate apresentaram concentrações intermediárias de compostos fenólicos e atividade antioxidante pela inibição do radical DPPH•. Os filmes elaborados com extrato de erva mate apresentaram características visuais muito semelhantes ao filme controle, com homogeneidade e certa maleabilidade. Além disso, os filmes apresentaram aumento na opacidade quando adicionados de extrato de erva mate. O teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos filmes foram superiores ao filme controle (sem extrato) comprovando a obtenção de filmes com propriedades de embalagens ativas. As aplicações para este tipo de embalagem são inúmeras, como por exemplo, a aplicação em alimentos com teor considerável de lipídios.

## 6 REFERÊNCIAS

- ARCAN, I.; YEMENICIOĞLU, A. Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. **Food Research International**, v. 44, n. 2, p. 550–556, 2011.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, London, v.28, n.1, p.25-30, 1995.
- BURRIS, K. et al. Composition and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.): A review. **Chilean Journal of Agricultural Research**, 72(2):268-274, 2012.
- CUSHNIE, T. P. T; LAMB, A. J. Recent advanced in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International. Journal. Antimicrobial. Agents**, v.238, p.99-107, 2011.
- DEBEAUFORT, F. A. Edible films and coatings: tomorrow's packaging: a review. **Critical Reviews in Food Science**, v. 38, p. 299-313, 1998.
- DAMODARAN, D., PARKIN, L. L., FENNEMA O. R. **Química de alimentos de Fennema**, Ed. Artmed, 4<sup>o</sup> ed. Porto Alegre, 2010.
- FERNANDES, C. E. F. et al, Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts **Industrial Crops and Products**, v.81,139-146, 2016.
- FILIP R. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutriton Research** 20: 1437-1446, 2000.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in enzymology**, 1987, 148: 350-382
- MACCARI JUNIOR, A.. Produtos Alternativos e Desenvolvimento da Tecnologia Industrial na Cadeia Produtiva da Erva-Mate. Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva - Mate / MCT / CNPq / Projeto PADCT Erva-Mate. Curitiba, 2000. 176 p.
- MEDA, A., L.. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, 91, 571-577.
- PRADO, A. C. P do, et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Brazilian Journal of food technology**, 2010, 12.4
- RODIGHERI, H. R. Custos, produtividade e renda da erva mate cultivada na região de Guarapuava, PR. **Colombo: EMBRAPA/CNPF**, 1995. 22p.
- RODRIGUES-AMAYA, D. B. **Food Carotenoids: chemistry, biology and technology**, Ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2016.