

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto Sensu*
DOUTORADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

SIMONE ROSA DA SILVEIRA LAZZAROTTO

**AVALIAÇÃO TERMOANALÍTICA E CROMATOGRÁFICA DE AMIDOS
INCORPORADOS COM EXTRATOS CRIOCONCENTRADOS DE ERVA-MATE**

PONTA GROSSA

2021

SIMONE ROSA DA SILVEIRA LAZZAROTTO

**AVALIAÇÃO TERMOANALÍTICA E CROMATOGRÁFICA DE AMIDOS
INCORPORADOS COM EXTRATOS CRIOCONCENTRADOS DE ERVA-MATE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Orientador: Prof. Dr. Egon Schnitzler

PONTA GROSSA

2021

L432 Lazzarotto, Simone Rosa da Silveira
Avaliação termoanalítica e cromatográfica de amidos incorporados com
extratos crioconcentrados de erva-mate / Simone Rosa da Silveira Lazzarotto.
Ponta Grossa, 2021.
78 f.

Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Área de
Concentração: Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de
Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Egon Schnitzler.

1. Ilex paraguariensis. 2. Crioconcentração. 3. Incorporação em amido. 4.
Análise térmica. 5. Clae. I. Schnitzler, Egon. II. Universidade Estadual de Ponta
Grossa. Ciências e Tecnologia de Alimentos. III.T.

CDD: 664.2

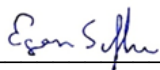
TERMO DE APROVAÇÃO

SIMONE ROSA DA SILVEIRA LAZZAROTTO

“ Avaliação termoanalítica e cromatográfica de amidos incorporados com extratos crioconcentrados de erva-mate”.

Tese aprovada como requisito para obtenção do grau de Doutor(a) no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:



Prof. Dr. Egon Schnitzler



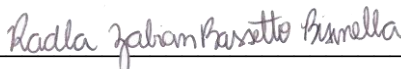
Prof Dr. Tiago André Denck Colman



Prof^a. Dr^a. Cleoci Beninca



Prof Dr. Luiz Gustavo Lacerda



Prof^a. Dr^a. Radla Zabian Bassetto Bisinella

Ponta Grossa, 11 de março de 2021.

*Ao meu companheiro de todas as horas
e amor da minha vida Marcelo, `as
minhas filhas amadas Rebeca e Larissa, e aos
meus pais Gomercindo e Serlei,
dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À Jesus Cristo, em primeiro lugar, pois Ele que me deu forças e sabedoria para completar essa missão, essa conquista é Dele e por Ele;

Ao Marcelo, esposo, companheiro em todos os momentos e meu melhor amigo;

As minhas filhas Rebeca e Larissa, que me apoiaram em todo momento, sentiram minha ausência, mas foram fortes, sonharam comigo e me deram forças para concretizar esse trabalho;

Ao meu pai Gomercindo e minha mãe Maria Serlei, que me ensinaram a lutar por meus sonhos e nunca desistir;

À minha sogra Maria Renita Lazzarotto, que me ajudou em todos os momentos que precisei;

Ao meu cunhado Marcio que me ajudou na compreensão dos eventos químicos;

Ao Professor Egon que para mim sempre foi mais que um orientador, um pai, um exemplo para seguir por toda vida;

Ao Professor Marcelo Lazzarotto pela coorientação neste trabalho e por compartilhar comigo seus valiosos conhecimentos;

Ao Ivar, orientador na Embrapa Florestas e amigo que me ensinou muito sobre a erva-mate;

Às amigas de grupo de pesquisa Ana Cláudia da Silveira, Geisa de Siqueira, Polyanna Silveira Hornung, Camila Bert e Cristina Soltovski que me ajudaram em muitos momentos;

Aos professores Alessandro Noqueira, Ivo Demiate, Luiz Gustavo Lacerda, Tiago André Colman, Cleoci Beninca e Radla Bisinella que colaboraram com seus ensinamentos e amizade;

À Catie Godoy, que disponibilizou seu laboratório para conclusão deste trabalho;

À minha turma de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial a minha amiga e colega Graziela Bragueto Escher, que foi minha companheira de viagens e um grande apoio;

Aos Professores da Pós-Graduação, pelos conhecimentos divididos conosco;

Ao meu neurologista Dr Henry Sato, que ajudou nos piores momentos da doença e proporcionou tratamentos para que eu conseguisse continuar o trabalho;

A minha psicóloga Cassia Miertschink, que me deu todo apoio para superar as limitações decorrentes da doença para conseguir concluir o doutorado;

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG, pelas análises prestadas;

À Embrapa, pela estrutura física e pessoal; por possibilitar que esta pesquisa acontecesse;

À CAPES pelo auxílio financeiro.

*“Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas.
A ele seja a glória para sempre! Amém”
Romanos 11:36*

RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) possui alto teor de compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides), metilxantinas (teobromina e cafeína) e saponinas. O amido é excelente excipiente, e capaz de ligar em sua estrutura outras moléculas e transporta-las no organismo. Amidos incorporados com extratos de erva-mate podem trazer benefícios à saúde, como diminuição dos índices lipídicos e glicêmicos, diminuição do stress oxidativo e estimular o sistema nervoso central (SNC) e a queima de gordura corporal. A técnica de crioconcentração é muito relevante para obter um extrato aquoso de erva-mate com maior teor de compostos bioativos sem alterações nas propriedades químicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a incorporação dos extratos crioconcentrados de erva-mate em amido de milho, através de métodos termoanalíticos e cromatográficos. As etapas de crioconcentração foram avaliadas através do aumento da densidade (D), dos teores de sólidos totais (ST), de cinzas (C) e de matéria orgânica (MO). Nas análises de ST, cinzas e MO o fator de concentração variou de 116,14 % a 336,01% comparando todas as etapas do processo de crioconcentração, porém os maiores valores foram encontrados entre as etapas EI e o C2. A eficiência entre as etapas de crioconcentração variou entre 32,23 % e 66,01 % para os ST, 34,79 % a 73,24 % para a MO e 15,59 % a 49,31 % para as cinzas. Também foram avaliadas as concentrações nos extratos obtidos de alguns bioativos da erva-mate (ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, rutina, teobromina e cafeína) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Nestes resultados observou-se que o ácido 5-cafeoilquínico, o ácido 3,5-dicafeoilquínico, a rutina, a cafeína e a teobromina aumentaram significativamente entre as etapas EI e o C2. Através da análise térmica foi avaliada a interação do amido de milho com os compostos bioativos dos extratos aquosos de erva-mate. As curvas obtidas através da análise de Termogravimetria e da Análise Térmica Diferencial (TG-DTA) apresentaram aumentos nas intensidades dos eventos exotérmicos nas amostras com o avanço das etapas de crioconcentração. Estes resultados confirmam que houve aumento nos índices de oxigênio, liberando energia em temperaturas mais altas. Nas análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) observou-se que as amostras de amido de milho incorporadas com extratos de erva-mate tiveram os valores de entalpia de gelatinização (ΔH) aumentados em todos os estágios da crioconcentração. Estes resultados mostram que os compostos oxigenados da erva-mate (polifenóis, e metilxantinas) foram incorporados nos amidos, pois alteraram suas propriedades térmicas. O uso desta técnica de incorporação de extratos de erva-mate em amidos aliado ao processo de crioconcentração pode ser útil para o desenvolvimento de um alimento nutracêutico, buscando produtos com qualidades funcionais.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*. Bioativos da erva-mate. Crioconcentração. Incorporação em amido. Análise térmica. CLAE.

ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) has a high content of phenolic compounds (phenolic acids and flavonoids), methylxanthines (theobromine and caffeine) and saponins. Starch is an excellent excipient, able to binding other molecules in its structure and transporting in the body. Starches incorporated with yerba mate extracts can bring health benefits, how to decrease lipids and glycemic indexes, decrease oxidative stress and stimulate the Central Nervous System (CNS) and the body fat burning. The freeze concentration technique is very relevant to obtain yerba mate aqueous extract with a higher content of bioactive compounds without changes in the chemical properties. The aim of this work was to evaluate the incorporation of the freeze concentrated yerba mate extracts in corn starch, using thermoanalytical and chromatographic methods. The steps of freeze concentration were evaluated by increasing of the density (D), of the total solids contents (ST), ash and organic matter (MO). In the ST analysis, ash (C) and MO the concentration factor ranged from 116.14% to 336.01% comparing all stages of the freeze crioconcentration process, however the highest values were found between EI and C2 steps. The efficiency between the crioconcentration steps ranged between 32.23% and 66.01% for ST, 34.79% to 73.24% for MO and 15.59% to 49.31% for ashes. The concentrations of some bioactive compounds in the yerba mate extracts were also evaluated (5-caffeoylquinic acid, 3,5-dicafeoylquinic acid, rutin, theobromine and caffeine) by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). In these results it was observed that 5-caffeoylquinic acid, 3,5-dicafeoylquinic acid, rutin, theobromine and caffeine (bioactive compounds present in yerba mate), increased significantly between EI and C2 steps. Through thermal analysis was evaluated the interaction of corn starch with the bioactive compounds of the yerba mate aqueous extracts. The curves obtained through the analysis of Thermogravimetry and Differential Thermal Analysis (TG-DTA) curves showed that the intensity of exothermic peaks increased with freeze-concentration steps advance. These results confirm that there was an increase in oxygen levels, releasing energy at higher temperatures. In the Differential Scanning Calorimetry (DSC) analyzes it was observed that the incorporated corn starch samples with yerba mate extracts had the values of gelatinization enthalpy (ΔH) increased in all stages of freeze concentration. These results showed that the oxygenated compounds of yerba mate (polyphenols and methylxanthines) were incorporated into the starches, as they changed their thermal properties. The use of the yerba mate extracts incorporating technique into the starches together with the freeze concentration process can be useful for the development of a nutraceutical food, searching products with functional qualities.

Keywords: *Ilex paraguariensis*. Yerba mate bioactive compounds. Freeze concentration. Starch incorporation. Thermal analysis. HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Erva-mate	19
Figura 2	Fluxograma do beneficiamento da erva-mate	20
Figura 3	Estruturas químicas dos principais ácidos clorogênicos	22
Figura 4	Estruturas químicas dos principais flavonoides	22
Figura 5	Estruturas químicas da cafeína e teobromina	23
Figura 6	Estruturas químicas do ácido ursólico e do ácido oleanólico	24
Figura 7	Esquema do fenômeno de separação dos compostos não voláteis durante o processo de crioconcentração	27
Figura 8	Representação da interação entre compostos bioativos e amido	32
Figura 9	Representação da curva DSC	37
Figura 10	Variedade de erva-mate comercial BRS 408 proveniente de material selecionado da Embrapa Florestas	38
Figura 11	Folhas de erva-mate secas em microondas	39
Figura 12	Folhas de erva-mate trituradas em liquidificador doméstico e tamizadas	39
Figura 13	Preparo do extrato aquoso de erva-mate	40
Figura 14	Esquema do procedimento de crioconcentração aplicado	41
Figura 15	Esquema do procedimento de incorporação dos extratos crioconcentrados de erva-mate em amido	44
Figura 16	Resultados das análises de densidade e sólidos totais dos extratos provenientes da crioconcentração de acordo com a etapa do processo	48
Figura 17	Resultados das análises de cinzas e matéria orgânica dos extratos provenientes da crioconcentração de acordo com a etapa do processo	49
Figura 18	Evolução do teor de sólidos totais e cinzas dos concentrados e dos gelos em função dos estágios da crioconcentração	51
Figura 19	Evolução do teor de matéria orgânica dos concentrados e dos gelos em função dos estágios da crioconcentração	52
Figura 20	Teores das metilxantinas presentes nos extratos de erva-mate	55
Figura 21	Teores dos polifenóis presentes nos extratos de erva-mate	57
Figura 22	Teores dos flavonóides presentes nos extratos de erva-mate	58
Figura 23	Teores dos compostos não identificados Ni 1 nos extratos de erva-mate	59
Figura 24	Teores dos compostos não identificados Ni 2 e Ni 3 nos extratos de erva-mate	60
Figura 25	Curvas TG-DTA de amido de milho nativo (N) usando atmosfera de ar	61

Figura 26	Curvas TG-DTA de amidos de milho incorporados com extrato inicial de erva-mate (AEI) e com o extrato crioconcentrado da primeira etapa (AC1) usando atmosfera de ar	62
Figura 27	Curvas TG-DTA de amido de milho incorporados com extratos de erva-mate crioconcentrados da segunda (AC2) e terceira etapas (AC3) usando atmosfera de ar	63
Figura 28	Curvas TG-DTA de amido de milho incorporado com extratos de erva-mate crioconcentrados da quarta etapa (AC4) usando atmosfera de ar	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Aplicação industrial do amido	30
Tabela 2	Teor de densidade (D), sólidos totais (ST), cinzas (C) e matéria orgânica total (MO) dos extratos de erva-mate inicial (EI) e nos diferentes estágios de crioconcentração	47
Tabela 3	Teor de sólidos totais (ST), cinzas (C) e matéria orgânica (MO) do extrato de erva-mate inicial (EI) e dos gelos provenientes de cada estágio de crioconcentração	50
Tabela 4	Fator de concentração da crioconcentração	52
Tabela 5	Eficiência da crioconcentração em cada etapa do processo	53
Tabela 6	Teores das metilxantinas presentes nos extratos de erva-mate	54
Tabela 7	Teores dos polifenóis e flavonóides presentes nos extratos de erva-mate	56
Tabela 8	Teores dos compostos não identificados Ni 1, Ni 2 e Ni 3 nos extratos de erva-mate	59
Tabela 9	Resultados de TG-DTA do amido nativo e dos amidos incorporados com extratos crioconcentrados de erva-mate	65
Tabela 10	Resultados da análise de DSC para o amido nativo e incorporados com extratos crioconcentrados de erva-mate	67

LISTA DE SIGLAS

AC1	Amido incorporado com extrato crioconcentrado da primeira etapa
AC2	Amido incorporado com extrato crioconcentrado da segunda etapa
AC3	Amido incorporado com extrato crioconcentrado da terceira etapa
AC4	Amido incorporado com extrato crioconcentrado da quarta etapa
AEI	Amido incorporado com extrato inicial
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ΔH	Entalpia de Gelatinização
Δm	Perda de Massa
ΔT	Variação de temperatura
C	Cinzas
C1	Crioconcentrado da primeira etapa
C2	Crioconcentrado da segunda etapa
C3	Crioconcentrado da terceira etapa
C4	Crioconcentrado da quarta etapa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
D	Densidade
DP	Desvio Padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
E	Eficiência
EI	Extrato Inicial
FC	Fator de Concentração
G	Gelo
G1	Gelo da primeira etapa de crioconcentração
G2	Gelo da segunda etapa de crioconcentração
G3	Gelo da terceira etapa de crioconcentração
G4	Gelo da quarta etapa de crioconcentração
g	Gramas
h	Hora
IP	Índice de Peróxidos

kg	Quilograma
L	Litro
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MO	Matéria Orgânica
N	Amido nativo
Ni	Não identificados
Ni1	Não identificado 1
Ni2	Não identificado 2
Ni3	Não identificado 3
nm	Nanometro
° C	Graus Celsius
Ø	Diâmetro
pf	Ponto de Fusão
pH	Potencial de Hidrogênio
s	Segundo
SNC	Sistema Nervoso Central
ST	Sólidos Totais
T _a	Temperatura da Amostra
T _c	Temperatura de Conclusão
TG	Termogravimetria
T _o	Temperatura Inicial
T _p	Temperatura de Pico
T _r	Temperatura de Referência
TR	Tempo de retenção
T	Tonelada
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
UV	Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	ERVA-MATE	19
3.2	COMPOSTOS BIOATIVOS DA ERVA-MATE	21
3.3	EXTRATOS DE ERVA-MATE	24
3.4	CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA ERVA-MATE	25
3.5	CRIOCONCENTRAÇÃO	26
3.6	AMIDO	29
3.7	AMIDO MODIFICADO	30
3.8	INCORPORAÇÃO DE EXTRATO DE ERVA-MATE EM AMIDO	31
3.9	TÉCNICAS UTILIZADAS NA CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	34
3.9.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	34
3.9.2	Análise Térmica	35
3.9.2.1	<i>Termogravimetria</i>	35
3.9.2.2	<i>Análise Térmica Diferencial</i>	36
3.9.2.3	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial</i>	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	MATERIAIS	38
4.1.1	Coleta de amostras	38
4.1.2	Obtenção do amido	38
4.2	MÉTODOS	39
4.2.1	Secagem da Erva-mate	39
4.2.2	Trituração da Erva-mate	39
4.2.3	Preparo do Extrato Aquoso de Erva-mate	40
4.2.4	Aplicação do Protocolo de Crioconcentração	40
4.2.5	Determinação da densidade (D)	42
4.2.6	Determinação do teor de Sólidos Totais (ST)	42
4.2.7	Determinação do teor de Cinzas (C)	42

4.2.8	Determinação de Matéria Orgânica (MO)	43
4.2.9	Avaliação do Processo de Crioconcentração	43
4.2.10	Incorporação dos Extratos Crioconcentrados de Erva-mate em Amido	43
4.2.11	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	44
4.2.11.1	<i>Preparo dos Extratos</i>	44
4.2.11.2	<i>Análise Cromatográfica por CLAE-UV</i>	45
4.2.12	Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial (TG-DTA)	46
4.2.13	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	46
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	DENSIDADE, SÓLIDOS TOTAIS E CINZAS DOS EXTRATOS CRIOCONCENTRADOS DE ERVA-MATE	47
5.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DOS EXTRATOS DE ERVA-MATE	54
5.3	AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE INCORPORAÇÃO POR ANÁLISE TÉRMICA	61
5.3.1	Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial (TG-DTA)	61
5.3.2	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	66
6	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

Desde 1988 as pesquisas com erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill.) têm aumentado, passando de duas, para 86 publicações anuais em 2019. Nos últimos 5 anos foram publicados 448 trabalhos científicos (WEB OF SCIENCE, 2020), evidenciando o aumento do interesse nesta espécie arbórea da família *Aquifoliaceae*. O Paraná é o estado brasileiro que mais produz erva-mate, em 2018 foi responsável por 345,09 mil/T (87 %) da produção do país. A erva-mate produzida no Brasil é destinada ao chimarrão, tereré e chá mate (IBGE, 2020).

A erva-mate possui ação antioxidante; hepatoprotetora; diurética; hipocolesterolêmica; hipoglicemiante; antiinflamatória; antiobesidade e estimulante do sistema nervoso central (SNC). Essas propriedades medicinais da erva-mate ocorrem devido à presença de compostos bioativos como, compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos), metilxantinas (alcalóides) e saponinas (triterpenos) (BOAVENTURA *et al.*, 2012; CHIANESE *et al.*, 2019; PRZYGODDA *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2017). Os compostos bioativos presentes nos extratos de erva-mate são passíveis de decomposição. Para manter a qualidade destes é necessário inativar enzimas oxidativas, através de técnicas como, sapeco, ciclos de extração e concentração (FAGGION *et al.*, 2016).

A crioc concentração é um processo tecnológico que promove a concentração de produtos alimentares, através do congelamento a baixas temperaturas e posterior separação parcial da água congelada. É uma técnica promissora para alimentos, pois preserva os compostos bioativos (AIDER; DE HALLEUX, 2009). Boaventura *et al.* (2013) realizaram o primeiro trabalho com crioc concentração em extratos de erva-mate, no qual observou que houve preservação dos compostos bioativos e maior concentração de compostos fenólicos. Boaventura *et al.* (2015) observaram que ao administrar por via oral os extratos crioc concentrados de erva-mate aos pacientes, melhoravam os níveis de colesterol, triglicerídeos, glicose, resposta do sistema imunológico e diminuíam o stress oxidativo. Porém constatou que alguns pacientes deixavam de usar os extratos por apresentarem um sabor forte.

Para viabilizar o uso dos extratos crioc concentrados de erva-mate pode-se utilizar técnica de incorporação de seus bioativos em amidos. Na literatura há alguns estudos sobre a incorporação de extrato de erva-mate em amido ou farinhas (CEBALLOS *et al.*, 2020; DELADINO *et al.*, 2008; DELADINO *et al.*, 2015; HORNUNG *et al.*, 2020; JARAMILLO *et al.*, 2015; JARAMILLO *et al.*, 2016; KNAPP *et al.*, 2019; LÓPEZ-CÓRDOBA, *et al.*,

2013; LÓPEZ-CÓRDOBA, *et al.*, 2014; LÓPEZ-CÓRDOBA, *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2017). O primeiro estudo sobre a incorporação de extratos crioconcentrados de erva-mate em amidos foi desenvolvido neste trabalho.

Para quantificar as metilxantinas e polifenóis nos extratos crioconcentrados de erva-mate foi aplicada a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para avaliar as transformações que ocorreram nos amidos incorporados com extratos crioconcentrados de erva-mate foram usadas as técnicas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA). Através das análises é observado que a incorporação dos extratos crioconcentrados em amido de milho foi proporcional a etapa de concentração do extrato de erva-mate usado e que ocorreu a incorporação de compostos bioativos na estrutura do amido milho. Este produto pode ter aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica, entre outras.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a incorporação de extratos crioconcentrados de erva-mate em amido de milho, através de métodos termoanalíticos e cromatográficos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Produzir extratos de erva-mate;
- 2) Crioconcentrar os extratos de erva-mate;
- 3) Incorporar os extratos crioconcentrados de erva-mate no amido de milho;
- 4) Quantificar as principais metilxantinas e polifenóis nos extratos de erva-mate por CLAE;
- 5) Avaliar as propriedades térmicas do amido antes e após a incorporação dos extratos de erva-mate, utilizando análise térmica (DSC e TG-DTA).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ERVA-MATE

Erva-mate (Figura 1) é uma árvore pertencente à família *Aquifoleaceae*, *Ilex paraguariensis* St. Hill é seu nome botânico, definido em 1820 pelo naturalista August de Saint Hilaire durante suas viagens pelo sul do Brasil. É originária da América do Sul, abrangendo Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai. Devido suas propriedades medicinais ela é amplamente conhecida e utilizada pelos habitantes destes países. Possui grande importância sócio econômica e cultural nestas regiões (GERKE *et al.*, 2017; PAGLIOSA *et al.*, 2010).

Figura 1 - Erva-mate



Fonte: Arquivo pessoal Ivar Wendling

As folhas de erva-mate são utilizadas para o preparo de infusões quentes ou frias, tradicionalmente conhecidos por serem estimulantes e bebidas digestivas. São formadas de açúcares, proteínas, gorduras, fibras, vitaminas (A, B1, B2, C, E) e sais minerais. Os compostos bioativos presentes na erva-mate dependem de fatores como genótipo usado, idade da planta e folhas, condições de solo, clima, época de colheita, tipo de cultivo e processamento (COLPO *et al.*, 2016; GERKE *et al.*, 2017; ISOLABELLA *et al.*, 2010; JACQUES *et al.*, 2007).

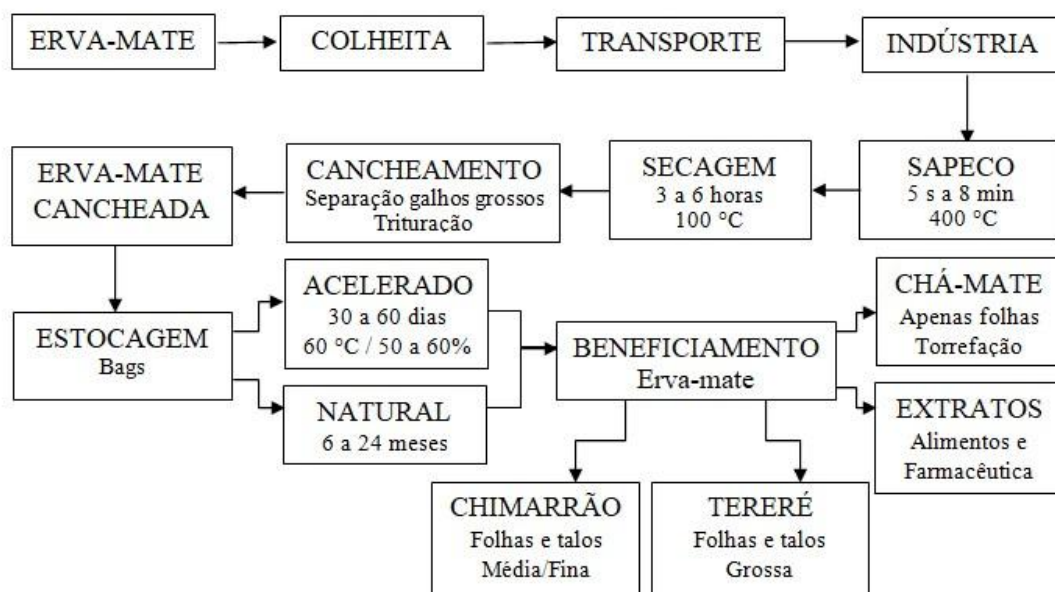
O consumo per capita de erva-mate no Brasil é estimado em 1,2 kg por ano. No entanto, na Argentina e Uruguai este consumo é cerca de 5 a 7 kg de erva-mate. A produção mundial de erva-mate está concentrada em três países sul-americanos: Brasil, Argentina e Paraguai. No Brasil, o Estado do Paraná é o maior produtor seguido respectivamente do Rio Grande do Sul

e Santa Catarina. A erva-mate brasileira é exportada para trinta países e o maior importador é o Uruguai (IBGE, 2020). No Brasil, 96 % do consumo da erva-mate destinam-se para o chimarrão e 4 % para produção de chás e outros usos (IBGE, 2020).

A produção e consumo de erva-mate tem aumentado devido aos seus benefícios para a saúde, atribuídos à presença de metabólitos secundários (metilxantinas, polifenóis e saponinas) (PAGLIOSA *et al.*, 2010; COLPO *et al.*, 2016). As pesquisas comprovam as atividades antioxidantes dos extratos de erva-mate e suas propriedades hepatoprotetoras, coleréticas, diuréticas, hipocolesterolêmicas, anti-reumáticas, antitrombóticas, antiinflamatórias, antiobesidade, antienvelhecimento, prevenção da deterioração de produtos alimentícios e de bebidas energéticas (BOAVENTURA *et al.*, 2012; BOAVENTURA *et al.*, 2015; LÓPEZ-CÓRDOBA *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2017). Os antioxidantes naturais podem elevar a qualidade nutricional como também prolongar a vida de prateleiras de alimentos (ISOLABELLA *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2008).

O processo de produção da erva-mate envolve a colheita das folhas que são secas sobre o fogo (sapeco), moídas (cancheamento), embaladas e armazenadas. Na Figura 2 é apresentado um fluxograma do processamento da erva-mate, etapas responsáveis por mudanças físico-químicas e sensoriais que geram características diferenciadas nos produtos (BASTOS *et al.*, 2007; ISOLABELLA *et al.*, 2010; TURNER *et al.*, 2011).

Figura 2 - Fluxograma do beneficiamento da erva-mate



Fonte: O autor

3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS DA ERVA-MATE

Compostos bioativos são os metabólitos secundários de plantas geralmente envolvidos na defesa contra organismos patogênicos ou raios ultravioletas que apresentam efeitos farmacológicos ou toxicológicos em humanos e animais.

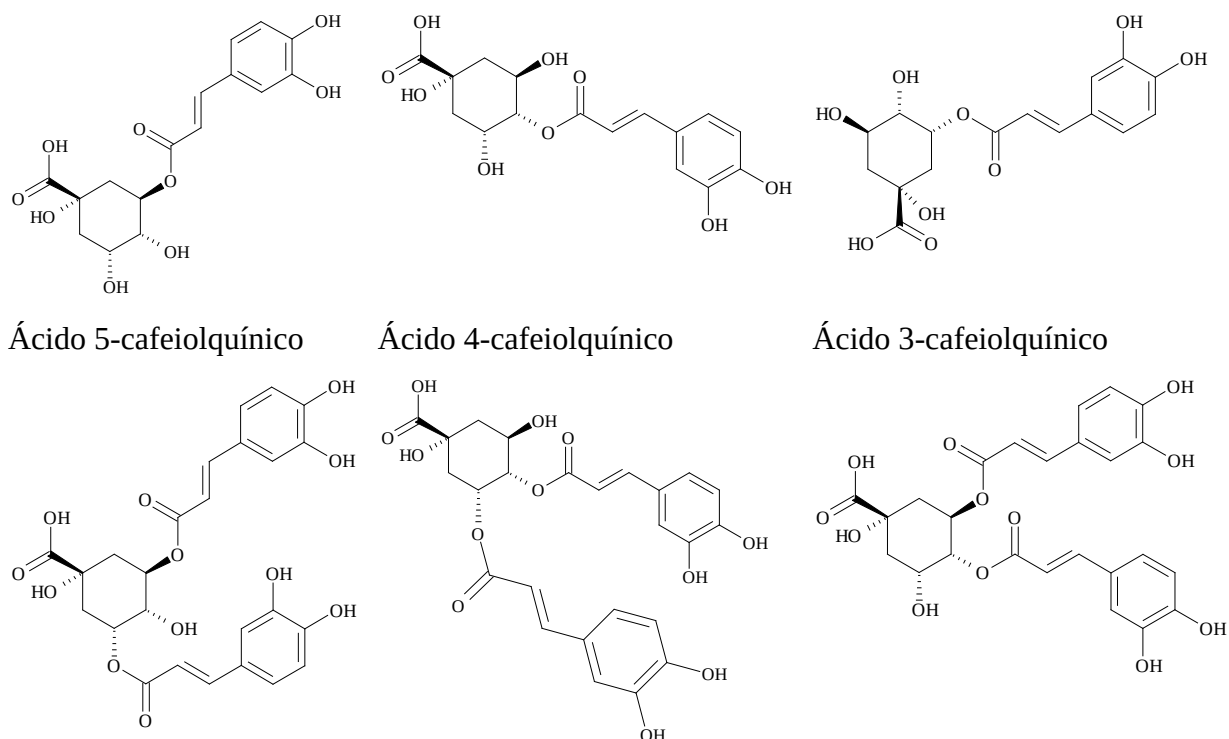
Na composição da erva-mate estão presentes compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos), alcalóides (como as metilxantinas cafeína, teobromina e teofilina), saponinas, minerais (cálcio, potássio, manganês e magnésio), clorofila, água, celulose, dextrina, glicose, pentoses, aminoácidos, substâncias graxas, resina aromática, ácido fólico (BASTOS *et al.*, 2007; BERTÉ *et al.*, 2011; MEINHART *et al.*, 2010). Os bioativos mais estudados nos extratos da erva-mate são os compostos fenólicos (grupo mais abundante nas folhas) e as metilxantinas (PAGLIOSA *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2008).

Os compostos fenólicos apresentam comportamento antioxidante, devido as suas propriedades redutoras, dificultando as reações radiculares, que causam estresse oxidativo aos tecidos (COLPO *et al.*, 2016; ISOLABELLA *et al.*, 2010). Estes se dividem em dois grupos principais: os ácidos fenólicos e os flavonóides.

Os ácidos fenólicos são os compostos relacionados com a atividade antioxidante da erva-mate e são os derivados do ácido cafeico, ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogênico), ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico (Figura 3). Diversas propriedades biológicas têm sido atribuídas à capacidade antioxidante dos fenólicos extraídos da folha da erva-mate. Estudos demonstram atividade na diminuição da progressão de aterosclerose, inibição do crescimento de células cancerígenas e prevenção do câncer (MOSIMANN; WILHELM FILHO; SILVA, 2006; MEJÍA *et al.*, 2010).

Diversas propriedades biológicas têm sido atribuídas à capacidade antioxidante dos fenólicos extraídos da folha da erva-mate. Estudos demonstram atividade na diminuição da progressão de aterosclerose, inibição do crescimento de células cancerígenas e prevenção do câncer (MOSIMANN; WILHELM FILHO; SILVA, 2006; MEJÍA *et al.*, 2010).

Figura 3 - Estruturas químicas dos principais ácidos clorogênicos



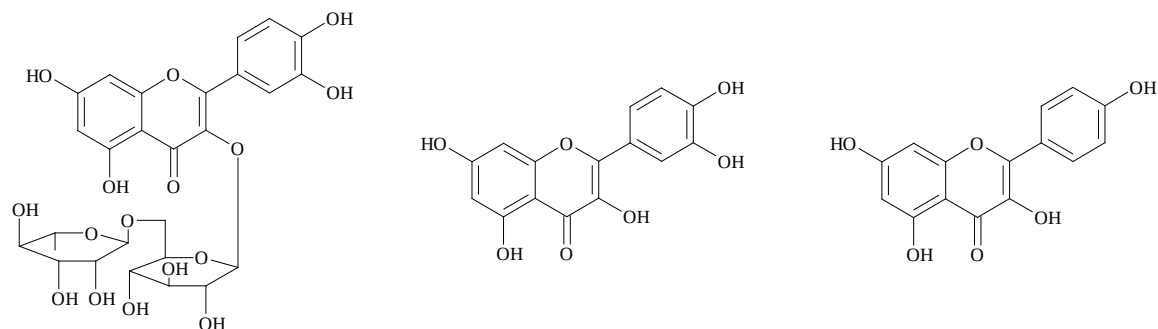
Ácido 3,5-dicafeiolquínico

Ácido 4,5-dicafeiolquínico

Fonte: O autor

Os flavóides da erva-mate possuem propriedades antiinflamatórias, anticarcinogênicas, antivirais, antihistamínicas, cardiovasculares, entre outras atividades (GERKE *et al.*, 2017; HECK; MEJÍA, 2007). Os flavonóides constituem 30 % da matéria seca das folhas frescas e os principais flavonóides da erva-mate são: a rutina, a quercetina e o kaempferol (Figura 4).

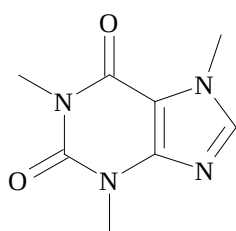
Figura 4 - Estruturas químicas dos principais flavonóides



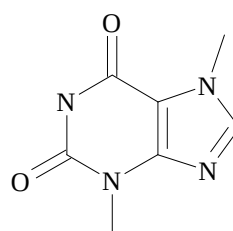
Fonte: O autor

As metilxantinas, como cafeína e teobromina (Figura 5), são os principais alcalóides purínicos encontrados nas folhas de erva-mate (MEINHART *et al.*, 2010). Esses constituintes, presentes na planta, são responsáveis principalmente pela atividade estimulante do sistema nervoso central (SNC) e pelo aumento da utilização de gordura como fonte energética (SILVA *et al.*, 2008; HECK; MEJÍA, 2007). Em estudos realizados foi observado que teor de cafeína presente na erva-mate foi responsável pela redução do peso corporal e da gordura abdominal de ratos (SILVA *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2007).

Figura 5 - Estruturas químicas da cafeína e teobromina



Cafeína



Teobromina

Fonte: O autor

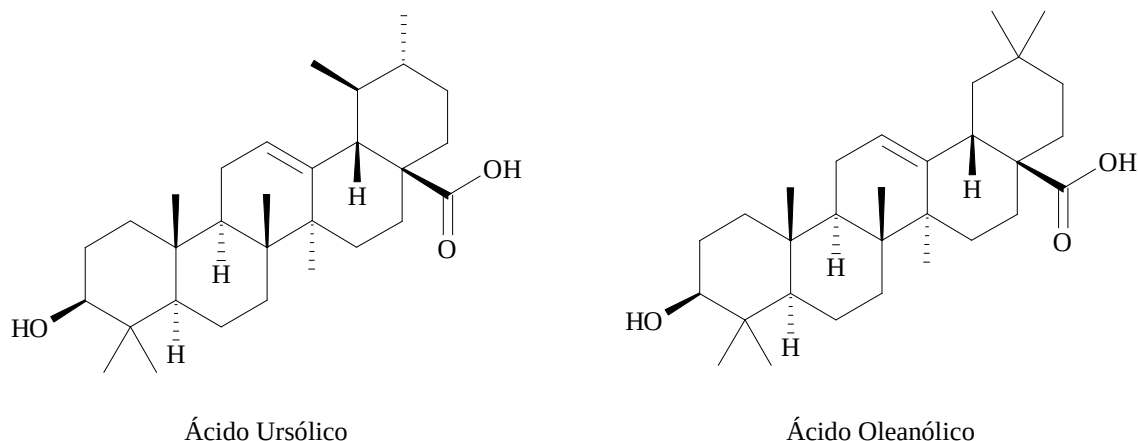
As saponinas apresentam características anfipáticas, ou seja, são constituídas por um núcleo lipossolúvel de estrutura esteroidal ou triterpenóide e apresentam em sua porção hidrossolúvel uma ou mais cadeias de carboidratos (glicosídeos) (KASSUIA *et al.*, 2019).

Nas folhas de erva-mate as saponinas encontradas em maior quantidade são as triterpênicas (10 %), contendo principalmente os núcleos de ácido ursólico ou de ácido oleanólico (Figura 6) (GNOATTO; SHENKEL; BASSANI, 2005).

As saponinas são solúveis em água, propriedade que confere às bebidas à base de erva-mate o gosto amargo e a formação de espuma (SPARG *et al.*, 2004). Essa habilidade de formar espuma das saponinas permite que elas sejam utilizadas na indústria como aditivos para alimentos e cosméticos (YANG; MCCLEMENTS, 2013; PIORKOWSKI; MCCLEMENTS, 2014).

Elas são consideradas hemolíticas, antiolesterolêmicas, antiinflamatórias, antiglicemiantes, antifúngicas, bactericidas, antitumorais, antivirais, antioxidantes e adjuvantes imunológicos (CHEOK; SALMAN; SULAIMAN, 2014; ELEKOFEHINTI, 2015; MORAIS *et al.*, 2009).

Figura 6 - Estruturas químicas do ácido ursólico e do ácido oleanólico



Fonte: O autor

3.3 EXTRATOS DE ERVA-MATE

Quando o café, o chá ou o chimarrão são preparados é realizada uma extração sólido-líquido. Neste caso, os componentes que estavam na fase sólida (no pó de café ou nas folhas) passam para a fase líquida (água). Essa extração é descontínua em virtude da alta solubilidade dos componentes extraídos na água. Porém, nos casos onde o soluto é pouco solúvel ou quando objetiva-se maximizar a extração deste soluto, utiliza-se a técnica de extração contínua.

A extração é influenciada por vários fatores como tempo, temperatura, agitação, tamanho das partículas do sólido e a proporção soluto-solvente. Estes fatores determinam a qualidade do extrato. O tempo de contato entre sólido-solvente deve ser suficiente para permitir a saturação da solução. A temperatura usada industrialmente é de 100 °C. No entanto, esta temperatura pode ser menor para os compostos bioativos não serem danificados. Em relação ao tamanho das partículas do sólido, quanto menor o tamanho das partículas maior a extração. A proporção soluto-solvente deve ser adequada para não serem geradas soluções com baixas concentrações, cuidando para não haver perdas de compostos bioativos no resíduo gerado (PAGLIOSA *et al.*, 2010).

Muitos estudos foram realizados para melhorar e verificar as condições ideais para obtenção de extratos de erva-mate. Jensen e Zanoelo (2012) concluíram que as partículas de menor tamanho e temperaturas mais elevadas auxiliam no processo de extração. No entanto, Prudêncio *et al.* (2012) concluíram que a condição ótima para o preparo de extratos com maior teor de compostos fenólicos foi à temperatura de 85 °C e tempo de 1,5 min com uma proporção de sólido-líquido de 1:100 g/mL. Nesta mesma linha a pesquisa de Bassani, Nunes

e Granato (2014) concluíram que a extração de compostos fenólicos a 90 °C por 10 min aumentou o teor de ácido gálico equivalente por litro de extrato. Damiani *et al.* (2014) e Rodrigues *et al.* (2015) compararam a extração a quente e a frio de chás obtendo os melhores resultados nos tratamentos a frio.

As divergências encontradas nos estudos com relação às condições de extração, pode ocorrer devido as características das matrizes, tipo de solo usado no cultivo, tempo empregado para o ensaio de determinação de atividade antioxidante (DPPH), diluição da amostra, pH, solubilidade, tipo e concentração do solvente (BASSANI; NUNES; GRANATO, 2014).

3.4 CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA ERVA-MATE

Para reduzir custos de armazenamento e diminuir a atividade de água garantindo estabilidade microbiológica do produto, a água presente nos alimentos é removida. Os processos tecnológicos aplicados para este fim são: concentração (aumentam o conteúdo de sólidos em torno de 60 %) e desidratação (reduz o teor de água a menos de 10 %) (SILVA, 2003).

A concentração de compostos bioativos elimina parcialmente o líquido extrator, obtendo assim um concentrado de viscosidade e consistência variável (SONAGLIO *et al.*, 2007). A concentração por evaporação é bastante utilizada na indústria de alimentos por ser relativamente simples e apresentar custo limitado, desde que utilize bombas de calor econômicas (AIDER; DE HALLEUX; AKBACHE, 2007). No entanto, este processo pode causar danos na qualidade sensorial e nutricional dos produtos, pois utiliza temperaturas acima de 60 °C (NAKAGAWA; MAEBASHI; MAEDA, 2010).

A tecnologia de concentração por membranas é um método que tem sido utilizada com sucesso para concentrar compostos fenólicos (XU; WANG, 2005). Neste processo são utilizadas baixas temperaturas e mínimo consumo energético, mantendo a qualidade dos compostos termoinstáveis.

Murakami *et al.* (2011) e Prudêncio *et al.* (2012) aplicaram a tecnologia de nanofiltração para concentrar os compostos fenólicos das folhas da erva-mate e verificaram um aumento significativo no teor de compostos fenólicos totais. Do ponto de vista nutricional, essa tecnologia se mostrou efetiva para concentrar compostos bioativos da erva-mate, principalmente quando se trata de compostos termoinstáveis como os compostos fenólicos (NAKAGAWA; MAEBASHI; MAEDA, 2010). No entanto, a concentração por membranas

apresenta limitações devido a alguns fenômenos decorrentes do processo, como o efeito *fouling* (entupimento dos poros da membrana) (AIDER; DE HALLEUX; AKBACHE, 2007).

A crioc Concentração é aplicada no extrato aquoso de erva-mate visando concentrar seus compostos bioativos, em especial os compostos fenólicos. No estudo realizado por Boaventura *et.al.* (2013), foram avaliados os efeitos desta técnica no extrato aquoso de erva-mate. O teor de sólidos totais, compostos fenólicos e o fator de concentração aumentaram ao final do processo. A eficiência diminuiu devido à retenção de sólidos totais no gelo. Os teores de compostos fenólicos (ácido clorogênico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido cafeico, ácido gálico e 3,4-dihidroxibenzóico) e metilxantinas (cafeína e teobromina) apresentaram aumento na análise de CLAE.

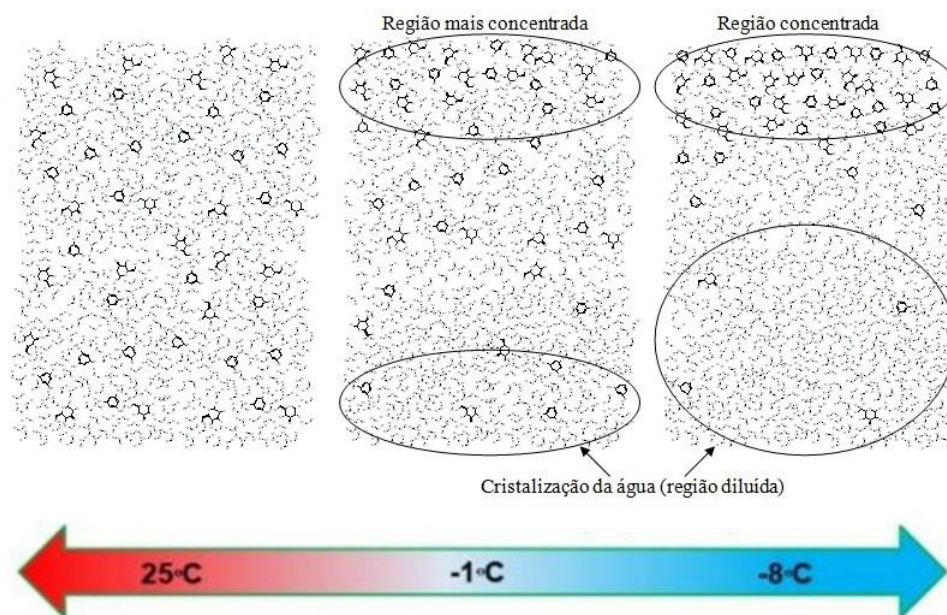
Em estudo posterior realizado por Boaventura *et.al.* (2015), foram avaliados o consumo de extratos crioc Concentrados de erva-mate. Neste estudo 31 voluntários ingeriram em jejum 200 mL de chimarrão, extratos crioc Concentrados de erva-mate ou água. Amostras de sangue foram coletadas antes e após 1 h da ingestão das bebidas, para verificar a atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione reduzida), peroxidação lipídica e capacidade antioxidante do soro. A ingestão de extratos crioc Concentrados de erva-mate promoveu aumento significativo das atividades das enzimas: catalase (28,7 %), superóxido dismutase (21,3 %), glutathione peroxidase (9,6 %) e glutathione reduzida (8,8 %). Também aumentou a capacidade antioxidante sérica (7,5 %). Enquanto os pacientes que ingeriram chimarrão apresentaram apenas aumento nos valores de glutathione reduzida (8,3 %). Os níveis séricos de peroxidação lipídica não apresentaram alterações significativas para ambas as bebidas. Os resultados sugerem que os extratos crioc Concentrados de erva-mate podem ser usados em indústria de alimentos e farmacêutica para aumentar o valor nutricional de produtos alimentícios e na formulação de nutracêuticos e suplementos dietéticos.

Assim, a crioc Concentração é uma tecnologia de concentração de bioativos considerada promissora em produtos alimentares naturais (AIDER; DE HALLEUX, 2009).

3.5 CRIOC CONCENTRAÇÃO

A crioc Concentração (Figura 7) é um processo tecnológico que promove a concentração de produtos alimentares, através do congelamento a baixas temperaturas e posterior separação de uma parte da água congelada, a partir de um produto líquido.

Figura 7 – Esquema do fenômeno de separação dos compostos não voláteis durante o processo de crioconcentração



Fonte: Arquivo pessoal de Marcelo Lazzarotto

Este processo apresenta vantagens como: diminuição da deterioração química (devido à baixa atividade enzimática e microbiológica), nenhuma perda de componentes voláteis, preservação das propriedades sensoriais, preservação dos compostos termicamente sensíveis, preservação da cor e aumento do valor nutricional dos produtos alimentares (BELÉN *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*; 2017; MIYAWAKI; INAKUMA, 2020). Além de permitir o aumento da qualidade do produto concentrado, reduz de três a quatro vezes os custos de capital, energia e limpeza quando comparado aos processos de evaporação ou osmose (SÁNCHEZ *et al.*; 2011; SABANCI; ICIER, 2020; WENTEN *et al.*; 2021).

Na crioconcentração ocorre a cristalização parcial da água em solução aquosa, em seguida os cristais são separados do concentrado, ou seja, durante o congelamento a água transforma-se em gelo (água purificada), aumentando a concentração dos solutos na fase líquida devido à quantidade decrescente de água disponível como solvente (FENNEMA, 2000; AIDER; DE HALLEUX, 2009). Devido a essa característica, os alimentos não congelam a uma temperatura fixa e sim em uma faixa de temperatura. A maioria dos alimentos começa a congelar a temperatura de -1°C a -3°C, sendo que a maior mudança de fase ocorre na faixa de -4°C a -10°C. O congelamento completo dos alimentos ocorre em temperaturas abaixo de -40°C (SINGH; SARKAR, 2005). A taxa de cristalização e a viscosidade do produto interferem diretamente no gelo formado e na separação da solução

concentrada, quanto mais viscoso o produto, mais demorado é o processo de formação dos cristais e de separação da solução concentrada (HERNÁNDEZ *et al.*, 2010).

Há diferentes métodos para a aplicação da tecnologia de crioconcentração, tais como o método de cristalização por suspensão, progressiva e blocos (AIDER; DE HALLEUX, 2009). A cristalização por suspensão é o sistema mais complexo, composto por trocadores de calor (geração dos cristais de gelo); tubo de recristalização (crescimento dos cristais); torre de lavagem (separação dos cristais). O líquido que irá ser concentrado é bombeado do tanque de alimentação para o trocador de calor, onde forma pequenos cristais instantaneamente. Os cristais menores são bombeados para o recristalizador, onde são misturados com os cristais maiores. Após essa etapa, os cristais e o concentrado são transportados à coluna de lavagem, ocorrendo o derretimento dos cristais de gelo e obtenção do concentrado final (AIDER; DE HALLEUX, 2009).

Outro método de aplicação é a crioconcentração progressiva, bem mais simples que o anterior, composto de compartimento cilíndrico, banho de resfriamento e sistema de condução da amostra, formando um único grande cristal de gelo ao invés de vários cristais menores. O cristal de gelo é formado na superfície de resfriamento do reservatório de cristalização (AIDER; DE HALLEUX, 2009; MIYAWAKI *et al.*, 2005; MIYAWAKI; INAKUMA, 2020).

A crioconcentração em blocos vem sendo relatada como promissora e eficaz à obtenção de produtos alimentícios com maior valor nutritivo e com maior preservação das propriedades sensoriais (AIDER; DE HALLEUX; AKBACHE, 2007; AIDER; DE HALLEUX, 2008; MORENO *et al.*, 2014). Este processo pode ser de forma parcial ou completa. A forma parcial, consiste em colocar a amostra líquida (extrato) em uma câmara de cristalização e introduzir um tubo com um agente refrigerante no centro.

A crioconcentração em blocos completa, consiste no congelamento total da solução seguida pelo descongelamento parcial pelo método de descongelamento gravitacional assistido. Neste método são obtidas duas frações, a primeira, a fração de concentrado (solução inicial) e a segunda, a fração do gelo contendo o mínimo de matéria seca. A eficiência desse processo é dependente do teor (quantidade) de impurezas no gelo (AIDER; DE HALLEUX; AKBACHE, 2007; BELÉN *et al.*, 2012). Segundo Aider e Halleux (2009) o bloco de gelo funciona como uma carcaça sólida onde a fração do fluido rico em sólidos passa. O controle da temperatura de descongelamento é fundamental e possibilita um aumento na eficiência do processo, possibilitando superar os 90 % de eficiência, o que resulta na redução da quantidade de sólidos retidos no gelo.

A crioc Concentração é uma técnica que pode ser aplicada, em diversos alimentos líquidos. Em estudo realizado com o soro do leite, foi possível observar que esta técnica preservou a composição nutricional, sendo possível obter um produto final com aproximadamente 35 % de sólidos totais (AIDER; DE HALLEUX; AKBACHE, 2007). E no estudo do soro de queijo de tofu e da água residual do tofu foi observado aumento nos teores de sólidos solúveis (SÁNCHEZ *et al.*, 2011; BELÉN *et al.*, 2012).

É muito utilizada na produção de sucos de uva, morango, maçã, pêssego, cereja e damasco, nos quais é possível observar o aumento significativo no teor de ácido ascórbico, compostos aromáticos e sólidos solúveis (AIDER; DE HALLEUX, 2008; HERNÁNDEZ *et al.*, 2009; HERNÁNDEZ *et al.*, 2010; SÁNCHEZ *et al.*, 2010). Em estudo realizado com extratos de café foi observado aumento nos teores de compostos bioativos e aumento da atividade antioxidante *in vitro* (MORENO *et al.*, 2014).

A crioc Concentração aplicada em extratos aquosos de erva-mate permite aumentar o teor dos compostos bioativos e a atividade antioxidante destes, sendo eficaz para preservar a qualidade nutricional dos extratos aquosos de erva-mate. Para Boaventura *et al.* (2013) esta técnica promoveu aumento no fator de concentração em relação ao teor de sólidos totais do extrato. O fluido concentrado apresentou aumento no teor de compostos fenólicos totais em todos os estágios da crioc Concentração. Embora a eficiência do processo tenha decrescido, devido à retenção dos compostos fenólicos na fração de gelo, ainda assim permaneceu em torno de 75% em todos os estágios. O ácido 5-cafeoilquínico, o ácido 3,5-dicafeoilquínico, o ácido cafeico, o ácido p-cumárico, o ácido gálico, a cafeína, a teobromina e a atividade antioxidante, aumentaram significativamente após todos os estágios da crioc Concentração. Além disso, os teores de compostos fenólicos e de metilxantinas foram correlacionados com o potencial antioxidante do extrato aquoso da planta.

3.6 AMIDO

O amido é um polissacarídeo formado por unidades de glicose, os dois principais componentes do amido são amilose e amilopectina (BENINCA *et al.*, 2013). Este polímero natural é encontrado em diversas fontes botânicas como cereais, raízes e tubérculos (FRANCO *et al.*, 2002; BICUDO *et al.*, 2009). É considerado o carboidrato mais importante na alimentação humana, pois representa 80 a 90 % dos polissacarídeos presentes na dieta (CEREDA, 2003; LAJOLO; MENEZES, 2006; LEONEL, *et al.*, 2011; SWEEDMAN *et al.*, 2013). A maior parte dos amidos contém de 20 a 30 % de amilose e 70 a 80 % de

amilopectina, e a proporção de amilose e amilopectina interfere diretamente na funcionalidade do amido (HENRÍQUEZ *et al.*, 2008). O amido é uma fonte renovável, biodegradável e atóxica, que possui diversas aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica, química, têxtil e de papel (Tabela 1) (LIU, 2005; VAN DER BURGT *et al.*, 2000).

Tabela 1 - Aplicação industrial do amido

Indústria	Utilização de amido/ amido modificado
Alimentícia	Modificador de viscosidade, filmes comestíveis, agente de brilho
Papeleira	Adesivo, revestimento
Têxtil	Dimensionamento, finalização e estampagem
Farmacêutica	Excipiente, diluente, aglutinante, encapsulamento
Detergente	Tensoativos, agente de suspensão, agente clareador
Agrícola	Pesticidas e cobertura de sementes
Plásticos	Embalagens de alimentos
Cosmética	Cremes e talcos
Purificação	Floculador

Fonte: Adaptado de Liu (2005)

Comercialmente o amido pode ser obtido a partir de cereais, especialmente de milho e trigo, e também de tubérculos e raízes, principalmente batata, batata-doce e mandioca. Dentre os amidos produzidos no Brasil, o amido de milho é o que representa maior quantidade (JOBLING, 2004). O amido de milho contém entre 25- 28 % de amilose (SIQUEIRA *et al.*, 2017), porém algumas variedades de milho não possuem amilose e são chamados de ceroso (“waxy”), enquanto outras possuem teores de amilose acima de 50 % e são denominados de *high*-amilose (REDDY; SEIB, 2000). Modificações químicas e físicas podem transformar esse carboidrato e lhe proporcionar características diferenciadas, ampliando e adaptando assim a sua aplicação industrial.

3.7 AMIDO MODIFICADO

O amido nativo é aquele obtido naturalmente, sem processos químicos, físicos ou biotecnológicos, sem alterações nas suas propriedades e funções. Entretanto a utilização industrial do amido nativo é limitada em função das condições de processamento, como temperatura, pH e forças de cisalhamento. O amido de milho ceroso é um bom exemplo. Os

grânulos não modificados hidratam facilmente, intumescem rapidamente, rompem-se, perdem viscosidade e produzem uma pasta pouco espessa, bastante elástica e coesiva.

Para ser utilizado na indústria de alimentos e outras é necessário promover modificações na estrutura do amido, com o intuito de desenvolver propriedades específicas, tais como solubilidade, textura, adesão, tamanho das partículas e tolerância às temperaturas de aquecimento (MANINGAT *et al.*, 2009). As modificações mais utilizadas no amido são de caráter físico, químico e biológico.

O amido é modificado fisicamente através de temperatura, umidade, pressão, cisalhamento e irradiação. A modificação química do amido ocorre através de tratamento ácido, *cross-linking*, oxidação, substituição, esterificação e eterificação. E a modificação biológica é realizada através da ação de enzimas (BENINCA *et al.*, 2013; HU; CHEN; GAO, 2009; MALUCELLI *et al.*, 2015). Outra forma de modificação é a interação com compostos bioativos, agregando moléculas com efeitos benéficos a saúde. Os amidos são excipientes que auxiliam na biodisponibilidade de compostos bioativos no organismo. Assim podem ser utilizados na produção de nutracêuticos e filmes. A adição de compostos bioativos de extratos de plantas, melhoram características nutricionais, propriedades tecnológicas e aumentam a vida útil dos produtos.

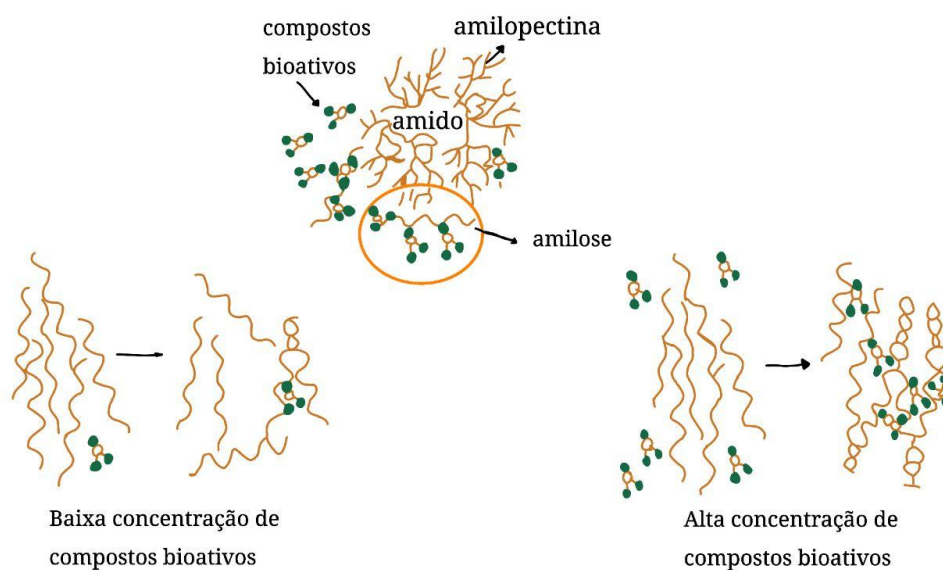
Em um estudo realizado por Zhu *et al.*, (2008) foram avaliados os efeitos dos extratos de romã, chá verde, espinheiro chinês, e galhas chinesas nas propriedades térmicas, físico-químicas e de textura do amido de trigo. Os extratos melhoraram as propriedades de pasta do amido, diminuíram a firmeza do gel, e reduziram a viscosidade final. Os compostos fenólicos alteraram as propriedades dos amidos, devido à presença de grupos hidroxilas e carboxilas, que competem pela água com o amido. A interação entre os compostos fenólicos e o amido alteraram a atividade de água, a força iônica da solução e o pH, alterando as propriedades de pasta do amido de trigo.

Wu, Chen e Li (2009) investigaram por DSC o efeito de polifenóis obtidos de chás na retrogradação de amidos de arroz, verificando um retardamento.

3.8 INCORPORAÇÃO DE EXTRATO DE ERVA-MATE EM AMIDO

A interação entre compostos bioativos e o amido (Figura 8) está sujeito a vários fatores como diversidade dos compostos bioativos, propriedades físicas, tamanho das partículas, ponto de fusão, comportamento físico-químico do amido e as condições experimentais (ZHU, *et al* 20015, GUZAR; REGAEE; SEETHARAMAN, 2012).

Figura 8 – Representação da interação entre compostos bioativos e amido



Fonte: Larissa da Silveira Lazzarotto, adaptada de YU et al., 2021

Os mecanismos de interação intermoleculares entre o amido e os compostos bioativos podem envolver ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e iônicas (CHAI *et al.*, 2013; GUZAR; REGAEE; SEETHARAMAN, 2012). A ligação de hidrogênio ocorre através das ligações dos grupos hidroxila dos compostos bioativos com a água e com os grupos hidroxila do amido. Pois tanto a superfície externa de hélices da amilose como nos compostos bioativos possuem grupos hidroxila, dessa forma a ligação de hidrogênio pode ser responsável por suas interações (JAMARILLO *et al.*, 2016; LAZZAROTTO *et al.*, 2020).

A interação que ocorre entre o extrato aquoso de erva-mate com o amido, se baseia nas interações hidrofóbicas. O direcionamento dos compostos bioativos da erva-mate para o amido é o efeito hidrofóbico, regido pelo aumento da entropia com a dessolvatação do soluto orgânico. As moléculas de água da primeira camada de solvatação de solutos orgânicos são mais ordenadas do que as moléculas de água do solvente. Assim, quando as moléculas dos compostos bioativos da erva-mate passam para o amido, existe um ganho de desordem do sistema e um consequente ganho entrópico. Contudo, a geometria do “complexo composto bioativo-amido” é governada pelo conjunto de interações: ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo e Van der Waals. Modelos adequados para compreender as forças operantes neste tipo de complexação são os compostos de inclusão formados por ciclodextrinas e fármacos

(HEMINE *et al.*, 2020; TIAN; LIU; LIU, 2021).

A técnica de incorporação de extratos de erva-mate em amidos tem sido utilizada principalmente para a elaboração de biofilmes devido as suas propriedades antioxidantes (Web of Science, 2020). Em estudo realizado por Ceballos *et al.* (2020) foi observado que biofilmes produzidos com amido de mandioca e extrato de erva-mate podem ser utilizados como embalagens biodegradáveis e funcionais, devido as suas propriedades antioxidantes. Em pesquisa realizada por Hornung *et al.* (2020), extratos de frutos de erva-mate foram incorporados em amido de milho para obtenção de biofilmes. Foi observado que esta interação aumentou a capacidade antioxidante e plasticidade dos biofilmes e previniu a deterioração oxidativa dos mesmos.

Jaramillo *et al.* (2015) estudaram o efeito da adição de extrato de erva-mate em biofilmes de amido de mandioca. Os autores observaram que os biofilmes apresentaram resistência a ruptura e flexibilidade, demonstrando que a erva-mate possui efeitos plastificantes. Também foi analisada a atividade antioxidante dos biofilmes à base de amido de mandioca, no qual se mostrou efetiva.

Em pesquisa complementar realizada por Jaramillo *et al.* (2016) foram estudados os efeitos da adição dos extratos de erva-mate na biodegradabilidade e plasticidades dos biofilmes obtidos com amido de mandioca. No estudo foi observada redução nas interações moleculares entre as cadeias de amido-amido e fortalecimento das interações de ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxila do amido e dos compostos polares do extrato de erva-mate. Através da análise térmica observaram que a estabilidade térmica dos filmes foi de 240 °C (TG) e que a temperatura de fusão e a entalpia de gelatinização (DSC) diminuíram com o aumento do teor de extrato de erva-mate. A incorporação do extrato de erva-mate melhorou as características plastificantes dos biofilmes produzidos e garantiu a biodegradabilidade destes antes de duas semanas.

Deladino *et al.* (2015) descreveram que a interação do amido com os compostos bioativos ocorreu devido à presença dos canais existentes na superfície do grânulo que fazem ligação com interior do grânulo. Sendo assim concluíram que o amido de milho foi capaz de incorporar os compostos bioativos dos extratos de erva-mate.

Teixeira *et al.* (2015) modificaram o amido de milho através da técnica de alta pressão hidrostática e adicionaram extratos de erva-mate, obtendo um amido com capacidade de transportar bioativos (polifenóis) da erva-mate em sistemas alimentares, aumentando seu valor nutricional. Zhu *et al.* (2015) realizaram uma revisão sobre as interações dos amidos com os compostos fenólicos e extratos vegetais. Observaram que apesar de haver alterações

nas propriedades reológicas, gelatinização e retrogradação, ainda há necessidade compreender melhor as interações entre amido e os compostos fenólicos.

López-Córdoba *et al.* (2014) realizaram o encapsulamento de extrato de erva-mate em alginato de cálcio com enchimento de amido de milho. Neste trabalho foi avaliado o mecanismo de liberação dos polifenóis da erva-mate em fluidos digestivos simulados e os efeitos do enchimento com o amido. As cápsulas com amido de milho tiveram menor porosidade levando a liberação modulada dos polifenóis da erva-mate no fluido gástrico simulado, retardando a taxa de liberação do biocomposto.

Machado *et al.* (2012) desenvolveram biofilme utilizando amido de mandioca, glicerol, nanocelulose do coco e extrato aquoso de erva-mate, com intuito de verificar sua ação antioxidante. Estes biofilmes foram utilizados para embalar azeite de dendê e foram armazenadas em condições controladas por quarenta dias. O índice de peróxidos (IP) do azeite de dendê embalado nos biofilmes contendo extrato de erva-mate, e nos filmes sem o extrato foi monitorado periodicamente. O azeite de dendê embalado nos biofilmes de extrato de erva-mate apresentou menor elevação no índice de peróxidos (IP), se mostrando eficiente como embalagem ativa, evitando a oxidação dos produtos lipídicos. Sendo assim, filmes à base de amido incorporados com extratos antioxidantes podem ser utilizados como embalagem ou revestimento na indústria alimentar como estratégia para aumentar a vida útil dos produtos embalados.

3.9 TÉCNICAS UTILIZADAS NA CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.9.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é um método de separação utilizada para identificar e quantificar os compostos químicos de extratos. Esta técnica consiste no bombeamento de um solvente líquido pressurizado contendo um extrato que passa através de uma coluna preenchida com um material sorvente (sílica). Cada composto químico da amostra interage de forma diferenciada com o material sorvente, gerando diferentes velocidades para cada composto e levando a separação conforme eles percorrem a coluna. Os principais componentes da cromatografia líquida são: a bomba, que movimenta a fase móvel e a amostra através da coluna; uma coluna, que contém a fase estacionária, geralmente formada por partículas de sílica, porosas, esféricas e diâmetro em torno de 35 µm, e um detector que mostra os tempos de retenção das moléculas, sendo que o tempo de retenção varia de acordo

com as interações da amostra com as fases estacionária e móvel. A CLAE é o tipo mais versátil e mais amplamente empregado de cromatografia por eluição (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2007).

3.9.2 Análise Térmica

Segundo Ionashiro, Caires e Gomes (2014), a análise térmica é utilizada com o objetivo de monitorar o comportamento de um determinado material em função do tempo ou da temperatura. Elas foram difundidas no Brasil por volta dos anos 60 por um grupo de pesquisa formado pelos professores Ernesto Giesbrecht, Ivo Giolito, Geraldo Vicentini, Madeleine Perrier, Lea Barbieri e Wesley W. Wendlandt. O uso da análise térmica cresceu muito desde então, ganhou notoriedade por sua variada aplicação, tanto na pesquisa quanto no desenvolvimento de produtos e controle de qualidade dos mesmos. As técnicas mais empregadas são: Termogravimetria (TG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Através delas são obtidas informações de variação de massa, estabilidade térmica, água livre e ligada, ponto de fusão e ebulição, calor de transição, calor específico, etc (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014).

3.9.2.1 Termogravimetria

A termogravimetria (TG) é uma técnica analítica que mede a diferença da massa de uma amostra em função da variação de temperatura ou tempo quando uma amostra é submetida a uma variação controlada de temperatura. Durante esse processo de diferença de massa em função da variação da temperatura é gerada uma curva termogravimétrica também conhecida como curva TG. As curvas TG fornecem dados necessários para prever a estequiometria, estabilidade térmica, composição e estabilidade dos compostos intermediários e a composição final da amostra (WENDLANDT, 1986). Nas curvas de TG, os desníveis em relação ao eixo das ordenadas correspondem às variações de massa sofridas pela amostra, permitindo a análise quantitativa dos dados (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014). A curva TG pode ser influenciada, por fatores instrumentais (razão de aquecimento do forno, atmosfera do forno, geometria do suporte de amostras e do forno), e pelas características da amostra (tamanho das partículas, quantidade de amostra, solubilidade dos gases liberados na própria amostra, calor de reação, compactação, condutividade térmica e natureza da amostra) (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014).

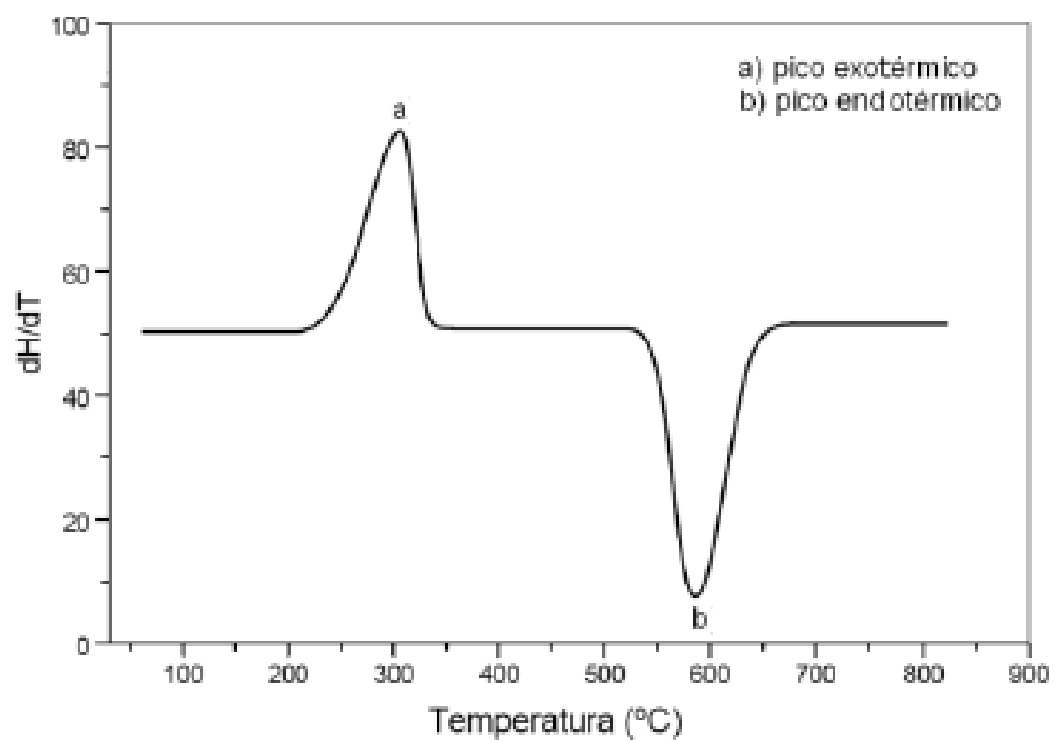
3.9.2.2 *Análise Térmica Diferencial*

A análise térmica diferencial (DTA) mede a diferença de temperatura entre uma amostra e um material de referência. Essas medições de temperatura são consideradas diferenciais por detectarem as diferenças entre a temperatura de referência (T_r) e a temperatura da amostra (T_a), em função da temperatura ou do tempo, onde o aquecimento ou resfriamento determinados serão sempre realizados em ritmo linear (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014). Por meio da utilização desta técnica é possível acompanhar os efeitos e as variações de calor relacionadas a alterações físicas ou químicas das amostras, como por exemplo, as transições de fase. Incluem-se nestas transições: fusão, ebulição, sublimação, congelamento e inversões de estruturas cristalinas; reações de desidratação, de dissociação, de decomposição, de oxidação-redução, entre outras (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014).

3.9.2.3 *Calorimetria Exploratória Diferencial*

A Calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica na qual a diferença na razão do fluxo de calor entre uma amostra e um material de referência é medida em função da temperatura ou tempo (Figura 9). Nesta técnica a propriedade física medida é a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência termicamente inerte, à medida que ambos são aquecidos ou resfriados de maneira controlada em um calorímetro. Esta técnica possibilita avaliar o efeito do calor associados com alterações físicas ou químicas da amostra, tais como: transições de fase (fusão, ebulição, sublimação, solidificação, mudanças de estruturas cristalinas); reações de desidratação; dissociação; decomposição; oxidação e redução. Geralmente transições de fase, desidratações, reduções e certas reações de decomposição são identificadas por eventos endotérmicos, enquanto cristalizações, oxidações, algumas reações de decomposição por eventos exotérmicos (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014).

Figura 9 - Representação da curva DSC



Fonte: IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Coleta de amostras

As folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) foram coletadas em Colombo (PR), no banco de germoplasma da Embrapa Florestas. Estas amostras são provenientes da cultivar BRS 408 (Figura 10) plantada em sistema semi-hidropônico em canaletas. As amostras foram coletadas em agosto de 2018, por meio de poda, após dois anos do plantio. Em seguida as folhas foram selecionadas, higienizadas, secas e moídas.

Figura 10 - Variedade de erva-mate comercial BRS 408 proveniente de material selecionado da Embrapa Florestas



Fonte: O autor

4.1.2 Obtenção do amido

O amido de milho foi adquirido no comércio local de Colombo/PR (lote: MC 056, validade: 04/19). As amostras de amido de milho foram secas em estufa a 35 °C por 24 h, para equilibrar a umidade. Após as amostras foram pulverizadas em almofariz com pistilo e armazenadas em dessecador com cloreto de cálcio anidro até a execução das análises.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Secagem da Erva-mate

Para a secagem das folhas de erva-mate foi utilizado o microondas, visando preservar os bioativos presentes nas folhas sem causar danos às mesmas e também por ser um método rápido e de fácil reprodução (PASSARDI *et al.*, 2006; HANSEL *et al.*, 2008; GUO *et al.*, 2017). O processo de secagem das folhas foi realizado em microondas (Eletrolux, modelo: MEP41, potência: 1500 w) (Figura 11), de acordo com metodologia modificada proposta por Hansel *et al.* (2008). Para secagem das folhas foram pesadas amostras de 100g, colocadas no suporte de secagem para microondas. Estas amostras foram secas por 5 min com potência de 70 % no microondas. Esta metodologia foi obtida em testes preliminares.

Figura 11 - Folhas de erva-mate secas em microondas



Fonte: O autor

4.2.2 Trituração da Erva-mate

As folhas de erva-mate foram trituradas em liquidificador doméstico (Mondial, modelo: Eletronic Filter Premium L-60, potência: 650 w) (Figura 12). O processo de moagem foi realizado utilizando amostras de 100 g de folhas de erva-mate secas, trituradas por 30 s. Após as folhas trituradas foram peneiradas em tamizes de 18 mesh (1,0 mm) e 35 mesh (0,5 mm) e armazenadas em recipientes plásticos a -18 °C até a preparação dos extratos (HANSEL *et al.*, 2008).

Figura 12 - Folhas de erva-mate trituradas em liquidificador doméstico e tamizadas



Fonte: O autor

4.2.3 Preparo do Extrato Aquoso de Erva-mate

Os extratos foram preparados utilizando 30 g de folhas suspensas em 1 L de água destilada (Figura 13) (Lazzarotto *et al.*, 2020). Após 3 min a 90 °C, sem agitação, o extrato de erva-mate foi filtrado a vácuo em papel Whatman nº 1, através de funil Büchner.

Figura 13 - Preparo do extrato aquoso de erva-mate



Fonte: O autor

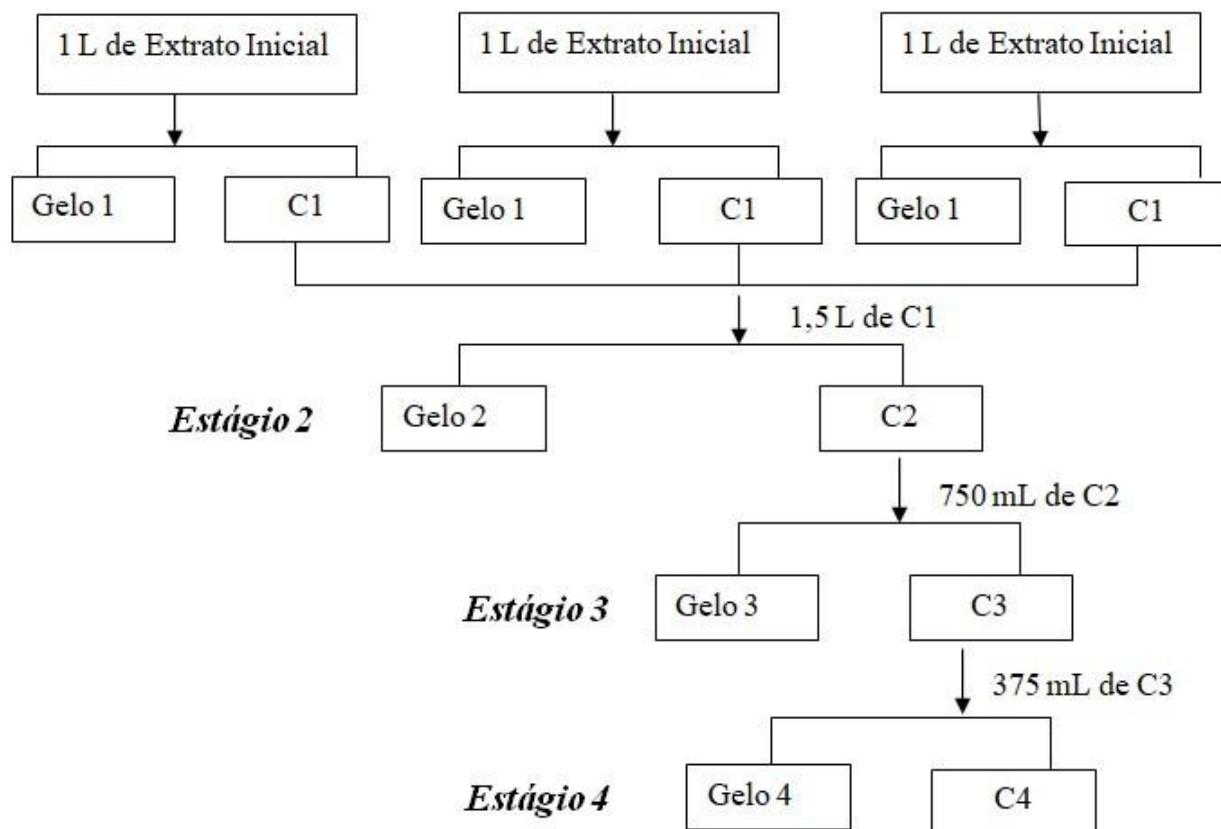
Foram preparados 9 L de extrato aquoso de folhas de erva-mate, para realizar a triplicata do processo de crioconcentração. Em cada batelada do processo foram necessários 3 L de extrato.

4.2.4 Aplicação do Protocolo de Crioconcentração

A metodologia aplicada para a crioconcentração dos extratos aquosos de erva-mate foi de acordo com Boaventura *et al.* (2013). Este método é chamado crioconcentração por blocos completa que consiste no congelamento total de uma solução, seguido pelo descongelamento parcial, sob a separação gravitacional simples. Sendo assim são obtidas duas frações: o fluido concentrado (C) e o gelo (G) (AIDER; DE HALLEUX; AKBACHE, 2007; AIDER; DE HALLEUX, 2009; AIDER; OUNIS, 2012). O congelamento dos extratos aquosos de erva-mate foi realizado em freezer convencional (marca: Eletrolux, modelo: FE 18). E o processo de crioconcentração foi realizado em triplicata.

Conforme o esquema proposto na Figura 14, um volume inicial de 3 L de extrato aquoso de folhas de erva-mate foi dividido em três lotes de 1 L, os quais foram congelados a -20 ± 2 °C.

Figura 14 - Esquema do procedimento de crioconcentração aplicado



Fonte: O autor

Nota: Primeiro crioconcentrado (C1), segundo crioconcentrado (C2), terceiro crioconcentrado (C3), quarto crioconcentrado (C4), gelo do primeiro crioconcentrado (G1), gelo do segundo crioconcentrado (G2), gelo do terceiro crioconcentrado (G3), gelo do quarto crioconcentrado (G4).

Após 24 h os 3 L de extrato inicial (EI) estavam completamente congelados. A seguir iniciou-se o processo de descongelamento, em temperatura ambiente (20 ± 2 °C), no qual foram necessárias 20 h para descongelar 50 % do volume do extrato inicial. A cada 1 L de extrato aquoso de erva-mate congelado foram obtidos, 500 mL de extrato concentrado, os quais foram medidos em proveta de vidro. O extrato concentrado (1,5 L) constituiu o primeiro estágio de crioconcentração (C1). Este concentrado obtido na primeira etapa (C1) foi congelado novamente a -20 ± 2 °C por 24 h. E a seguir foram descongelados 50 % do volume (750 mL), durante 20 h para obtenção do concentrado da segunda etapa (C2). O C2 foi congelado durante 24 h e 50 % do volume (375 mL) descongelado para obtenção do concentrado da terceira etapa (C3). Este procedimento foi repetido novamente para obtenção do quarto estágio (C4) com volume de 187,5 mL. Uma alíquota de 30 mL cada estágio do processo foi armazenada a -20 ± 2 °C para posterior incorporação nos amidos e análises químicas.

4.2.5 Determinação da densidade (D)

A metodologia de análise de densidade relativa dos extratos (EI, C1, C2, C3 e C4) foi adaptada da Farmacopeia Brasileira 6ª ed. (BRASIL, 2019). Um volume fixo de 1 mL do extrato foi pesado utilizando balança analítica em triplicata. Também foi obtida a massa de 1 mL de água destilada tipo II na mesma temperatura da amostra (20 °C). Utilizando o valor de densidade da água estabelecido pela Farmacopéia na temperatura mensurada no momento da análise, foi calculada a densidade relativa, conforme a Equação 1:

$$D = \frac{m_{amostra}}{m_{água}} \times D_{água\ tabela} \quad (1)$$

Em que D é a densidade relativa da amostra, $m_{amostra}$ é a massa experimental de determinado volume da amostra, $m_{água}$ é a massa experimental de determinado volume de água e $D_{água\ tabela}$ é a densidade teórica da água na temperatura mensurada.

4.2.6 Determinação de sólidos totais (ST)

O teor de sólidos totais das amostras de extratos de erva-mate (EI, C1, C2, C3 e C4) e dos gelos provenientes dos estágios de crioconcentração (G1, G2, G3 e G4) foi determinado através da perda de peso após secagem em estufa a 80 °C até peso constante e expresso como teor de sólidos totais/massa total (g/100g) (AOAC, 2016). Todas as análises dos concentrados e dos gelos foram realizadas em triplicata.

4.2.7 Determinação do teor de cinzas (C)

Essa análise foi realizada utilizando as amostras provenientes da determinação de perda por dessecação. A metodologia utilizada foi adaptada da Farmacopéia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019). A amostra dessecada foi levada ao forno mufla por 2 h a temperatura de no máximo 600 °C. O cadinho foi então resfriado em dessecador e pesado em balança analítica. O teste foi realizado em triplicata para cada extrato e a porcentagem de cinzas obtida comparando a massa inicial da amostra (antes da dessecação em estufa) com a massa das cinzas obtidas (m/m).

4.2.8 Determinação do teor de matéria orgânica (MO)

O teor de matéria orgânica (MO) presente nos extratos de erva-mate (EI, C1, C2, C3 e C4) foi calculado determinando a diferença entre o teor de sólidos totais (ST) e o teor de cinzas (C).

4.2.9 Avaliação do Processo de Crioconcentração

O fator de concentração de cada estágio de crioconcentração foi calculado em função do aumento da concentração da solução em relação à quantidade de teor de sólidos totais (ST) do extrato inicial de erva-mate (EI) (AIDER; OUNIS, 2012). O fator de concentração (%) é calculado a partir da Equação 2:

$$\text{Fator de concentração} = \frac{ST_n}{ST_0} \times 100 \quad (2)$$

Em que ST_n é o teor de sólidos totais (g) do concentrado de cada etapa de crioconcentração e ST_0 é o teor de sólidos totais do extrato aquoso inicial de folhas de erva-mate.

A eficiência do processo de crioconcentração foi calculado de acordo com a metodologia proposta por Belén *et al.* (2012). Este resultado avalia quanto eficiente foi cada etapa do processo. Este cálculo considera a relação da diferença dos teores de sólidos totais no crioconcentrado e do gelo pelo teor presente no crioconcentrado, Equação 3:

$$\text{Eficiência} = \frac{ST_f - ST_g}{ST_f} \times 100 \quad (3)$$

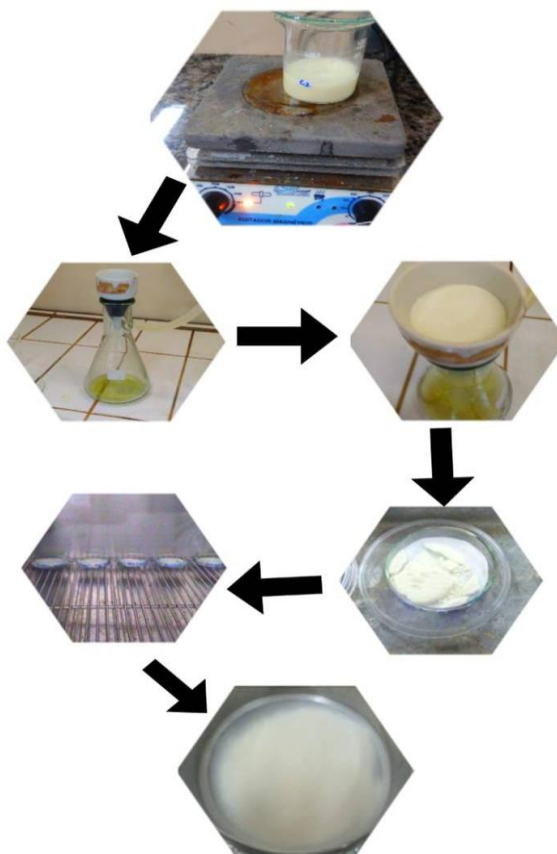
Sendo que ST_f é o resultado de uma análise da concentração no crioconcentrado e ST_g é o resultado de uma análise da concentração no gelo na mesma etapa da crioconcentração.

4.2.10 Incorporação dos Extratos Crioconcentrados de Erva-mate em Amido

Para incorporação dos extratos crioconcentrados de erva-mate em amido milho, foram pesadas 20 g de amido nativo (N) e adicionado em 100 mL de extrato de erva-mate,

este procedimento foi realizado para cada um dos extratos (EI, C1, C2, C3, C4). Cada béquer contendo o amido e os extratos crioconcentrados foram colocados em agitação magnética constante a 25 °C por 30 min. As amostras (AEI, AC1, AC2, AC3 e AC4) foram filtradas á vácuo, utilizando kitassato e funil de büchner com papel filtro 125 mm, e secas em estufa de circulação de ar a 35 °C por 24 h. Após as amostras foram pulverizadas com almofariz e pistilo, peneiradas em tamis de 80 e 170 mesh e mantidas em dessecador com cloreto de cálcio anidro até a execução das análises. Este procedimento pode ser melhor observado na Figura 15.

Figura 15 - Esquema do procedimento de incorporação dos extratos crioconcentrados de erva-mate em amido



Fonte: O autor

4.2.11 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.2.11.1 *Preparo dos Extratos*

As amostras de extratos de erva-mate (EI, C1, C2, C3 e C4) foram filtradas em membrana Chromafil® Xtra PA-45/25, poro de 0,45µm, Ø 25mm. Após 1 mL de cada

amostra foi transferido para vial e foi adicionado 50 µg mL⁻¹ do padrão interno umbeliferona (Sigma®) para análise em CLAE. As amostras foram preparadas em triplicata.

4.2.11.2 *Análise Cromatográfica por CLAE-UV*

As análises por CLAE foram conduzidas em triplicata, em cromatógrafo líquido Shimadzu® (UFLC), controlado pelo Software LC Solution e equipado com injetor automático e detector de UV (SPD-20A), no laboratório de Ecofisiologia Vegetal da Universidade Federal do Paraná. A separação dos compostos presentes nas amostras foi realizada conforme metodologia de Tomasi (2020). Para a separação dos compostos utilizou-se a coluna Shim-Pack CLC- ODS (M)® (250 x 4,6 mm, Ø 5 µm), a qual foi protegida por uma pré-coluna Shim-Pack CLC G-ODS® (10 x 4.0 mm, Ø. 5 µm), ambas da Shimadzu®. As condições de separação dos compostos presentes no extrato aquoso (20 µL de injeção) foram: 30 °C com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ de eluente com a fase móvel A (H₂O:ácido acético Alphatec® - 99,9:0,1 v/v) e B (acetonitrila Merck® - 100%). O comprimento de onda utilizado para detecção do composto foi 280 nm (fixo).

O programa de eluição com gradiente foi: 0–15 min (3 % B), 15–20 min (3–20 % B), 20–40 min (20 % B), 40–45 min (20–30 % B), 45–55 min (30–100 % B). A coluna foi mantida nessa condição por 20 min para a limpeza. Entre 75 e 80 min aplicou-se novamente a condição inicial de 3 % de acetonitrila, sendo mantida até 95 min para a estabilização da linha base do detector e da pressão do sistema. Soluções padrões dos compostos de teobromina, cafeína, ácido 5-cafeoilquínico, rutina e 3,5-dicafeioquinico, todos Sigma®, foram usadas para identificar esses compostos nas análises. Como padrão interno utilizou-se a umbeliferona. Para quantificação dos compostos foi utilizada uma curva para cada padrão analisado. Os pontos dos padrões foram calculados usando a equação 4.

O padrão interno foi adicionado na mesma concentração nas amostras de erva-mate e a equação 4 foi utilizada para determinar a relação de cada composto com o padrão interno. Estes valores foram usados para calcular a concentração da amostra expressando em mg de composto por grama de amostra, em base seca (mg g⁻¹).

$$P_j = \frac{A_p}{A_i} \quad (4)$$

Sendo P_j o valor do ponto da amostra com a concentração j . A_p é a área do padrão na concentração j e A_i é a área do padrão interno usado.

4.2.12 Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial (TG-DTA)

As curvas TG-DTA foram obtidas utilizando um sistema de análise térmica DTG 60H (Shimadzu, Japão), no laboratório de Tecnologia da Madeira na Embrapa Florestas. O instrumento foi calibrado previamente com pesos padrões e verificado com padrão de oxalato de cálcio mono-hidratado. As amostras foram aquecidas de 30 a 600 °C utilizando cadinhos de α -alumina abertos, com aproximadamente 5,0 mg de amostra, sob fluxo de ar comprimido de 100 mL min⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. O software utilizado para calcular as perdas de massa foi TA-60 WS (Shimadzu, Japão) (LAZZAROTTO *et al.*, 2017).

4.2.13 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise térmica de DSC foi realizada no Centro de Tecnologia Agroalimentar da Universidade Estadual de Ponta Grossa. O equipamento DSC Q-200 (TA Instruments, EUA) foi previamente calibrado de acordo com as especificações do fabricante e verificado com padrão de índio (99,99 % de pureza, p.f.= 156,6 °C e $\Delta H=28,56$ Jg⁻¹). Preparou-se uma suspensão de amido-água (1:4, m/v) em cadinhos de alumínio, os quais foram selados e deixados em repouso durante 1 h em temperatura ambiente (25 °C) antes do início da análise, para intumescimento dos grânulos. As seguintes condições foram utilizadas: massa de amostra de 2,5 mg, razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, atmosfera de ar com vazão de 50 mL min⁻¹, faixa de temperatura de 30 a 100 °C (BET *et al.*, 2016). O software Universal Analysis-2000 (TA Instruments, EUA) foi utilizado para obter e interpretar as curvas.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma vez realizadas as análises em triplicata, os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Para verificar se as amostras diferiram entre si, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e se houvesse distinções, o teste de Tukey foi utilizado para comparar as médias. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. Para o cálculo foi utilizado o software STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa-OK, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DENSIDADE, SÓLIDOS TOTAIS E CINZAS DOS EXTRATOS CRIOCONCENTRADOS DE ERVA-MATE

Conforme Boaventura *et al.* (2013) o teor de compostos bioativos dos extratos aquosos de erva-mate aumentam de acordo com o estágio da crioconcentração. Para avaliar o processo de crioconcentração nos extratos aquosos de erva-mate foram determinadas a densidade (D), teor de sólidos totais (ST) e o teor de cinzas (C) das amostras do extrato inicial (EI), primeiro crioconcentrado (C1), segundo crioconcentrado (C2), terceiro crioconcentrado (C3) e quarto crioconcentrado (C4). Conforme a Tabela 2 observa-se que o processo de crioconcentração foi efetivo, pois aumentando a D, aumenta o teor de ST e consequentemente o teor de MO (AIDER; DE HALLEUX; AKBACHE, 2007; AIDER; DE HALLEUX, 2008).

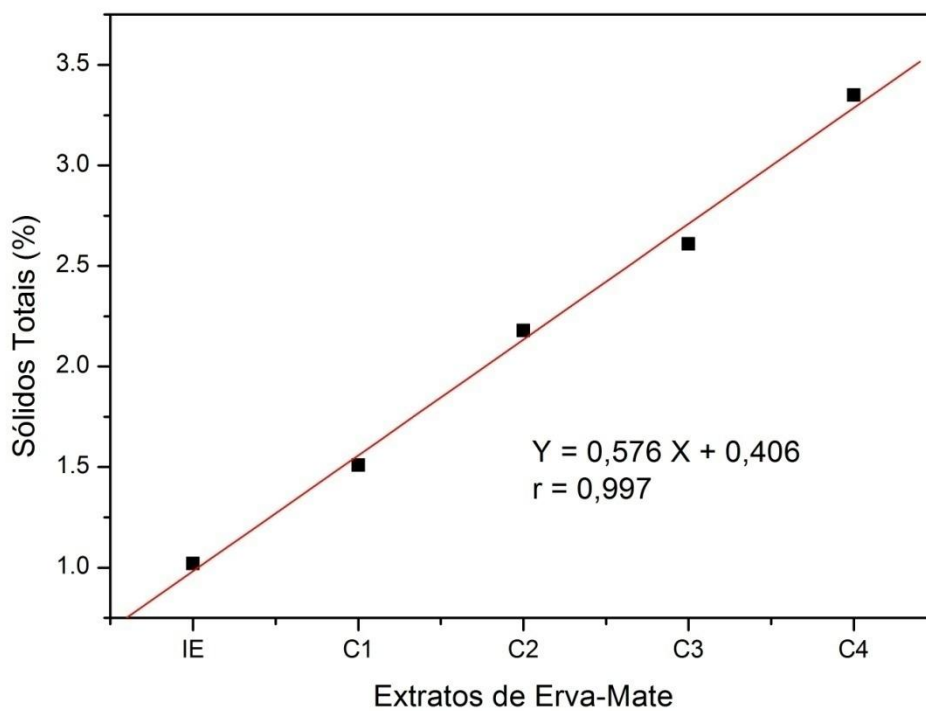
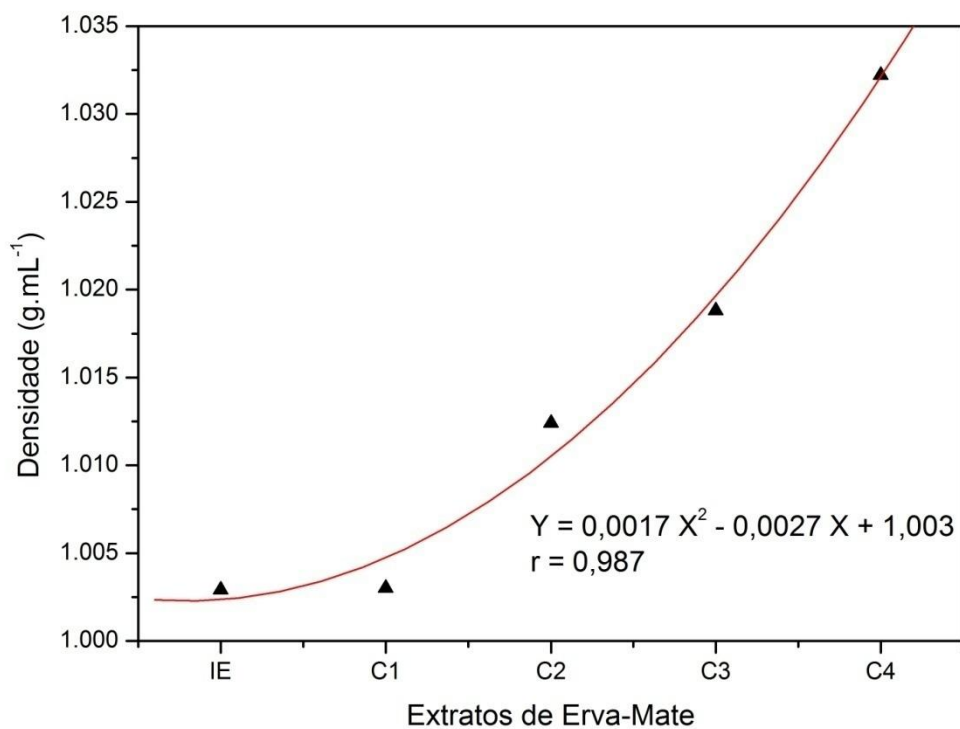
Tabela 2 – Teor de densidade (D), sólidos totais (ST), cinzas (C) e matéria orgânica total (MO) dos extratos de erva-mate inicial (EI) e nos diferentes estágios de crioconcentração

	D (g/mL)	ST (%)	C (%)	MO (%)
EI	1,0029 ± 0,0170 ^b	1,02 ± 0,05 ^e	0,20 ± 0,01 ^c	0,89 ± 0,06 ^e
C1	1,0030 ± 0,0106 ^b	1,51 ± 0,01 ^d	0,23 ± 0,09 ^{bc}	1,28 ± 0,07 ^d
C2	1,0124 ± 0,0065 ^b	2,18 ± 0,08 ^c	0,27 ± 0,07 ^{bc}	1,91 ± 0,01 ^c
C3	1,0188 ± 0,0168 ^{ab}	2,61 ± 0,10 ^b	0,32 ± 0,03 ^b	2,30 ± 0,09 ^b
C4	1,0322 ± 0,0034 ^a	3,35 ± 0,01 ^a	0,39 ± 0,03 ^a	2,96 ± 0,02 ^a

Nota: Médias com letras diferentes na coluna significam que são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P<0.05).

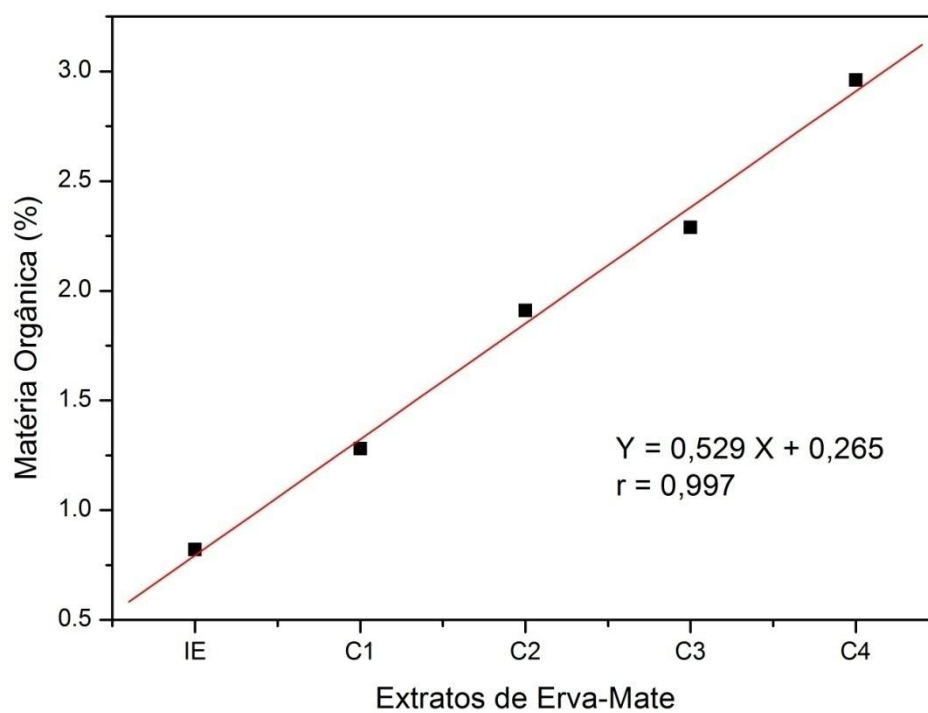
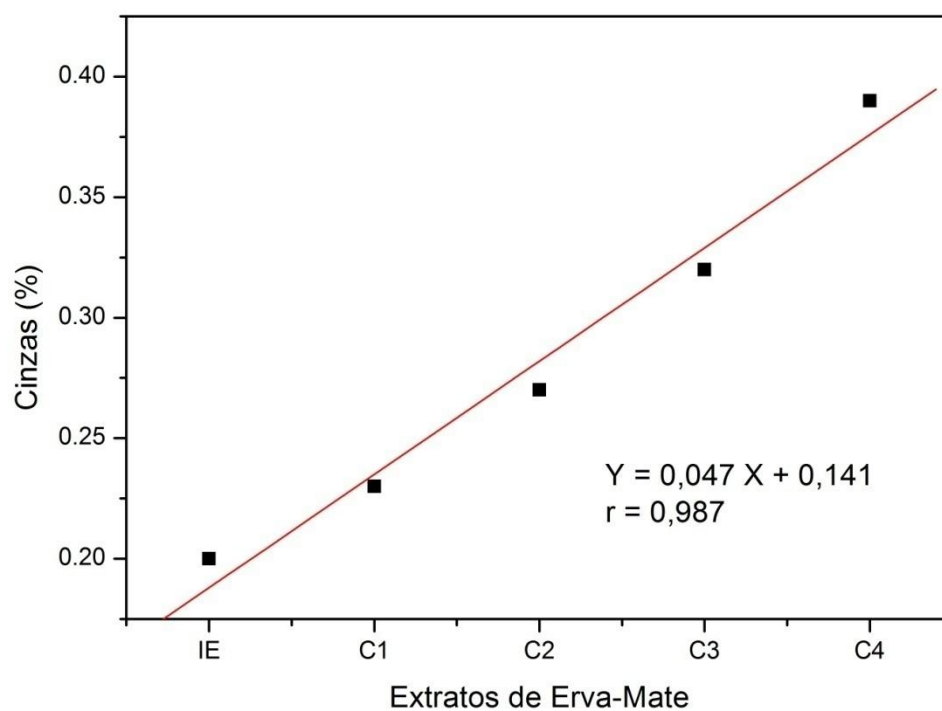
Na Figura 16 e na Figura 17 são visualizados os resultados das análises dos extratos provenientes da crioconcentração de acordo com a etapa do processo. Estes resultados são similares aos obtidos por Boaventura *et al.* (2013), sugerindo a eficiência na concentração do teor de compostos fenólicos e o aumento da atividade antioxidante.

Figura 16 - Resultados das análises de densidade e sólidos totais dos extratos provenientes da crioc Concentração de acordo com a etapa do processo.



Nota: (EI) é o extrato inicial e (C1, C2, C3, C4) são os extratos crioc Concentrados respectivos.

Figura 17 - Resultados das análises de cinzas e matéria orgânica dos extratos provenientes da crioc Concentração de acordo com a etapa do processo



Nota: (EI) é o extrato inicial e (C1, C2, C3, C4) são os extratos crioc Concentrados respectivos.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados de ST, C e MO dos gelos (G) obtidos dos extratos crioconcentrados de erva-mate. Observa-se que o teor de ST presentes nos gelos aumentou de acordo com as etapas de crioconcentração. Sendo assim, o aumento do teor de ST é significativo a partir do estágio G3. Também é observado que a eficiência do processo diminui com o aumento das etapas de crioconcentração. Durante o processo de separação do concentrado e do gelo, a fase congelada permanece com alto teor de ST. Este fenômeno pode ser responsável pela diminuição da eficiência do processo (AIDER; DE HALLEUX; AKBACHE, 2007). Resultado semelhante foi encontrado no estudo proposto por Boaventura *et. al.* (2013), no qual o teor de ST presentes no gelo na primeira etapa (C1) foi de $0,09 \pm 0,03$ e $0,55 \pm 0,03$ na quarta etapa (C4).

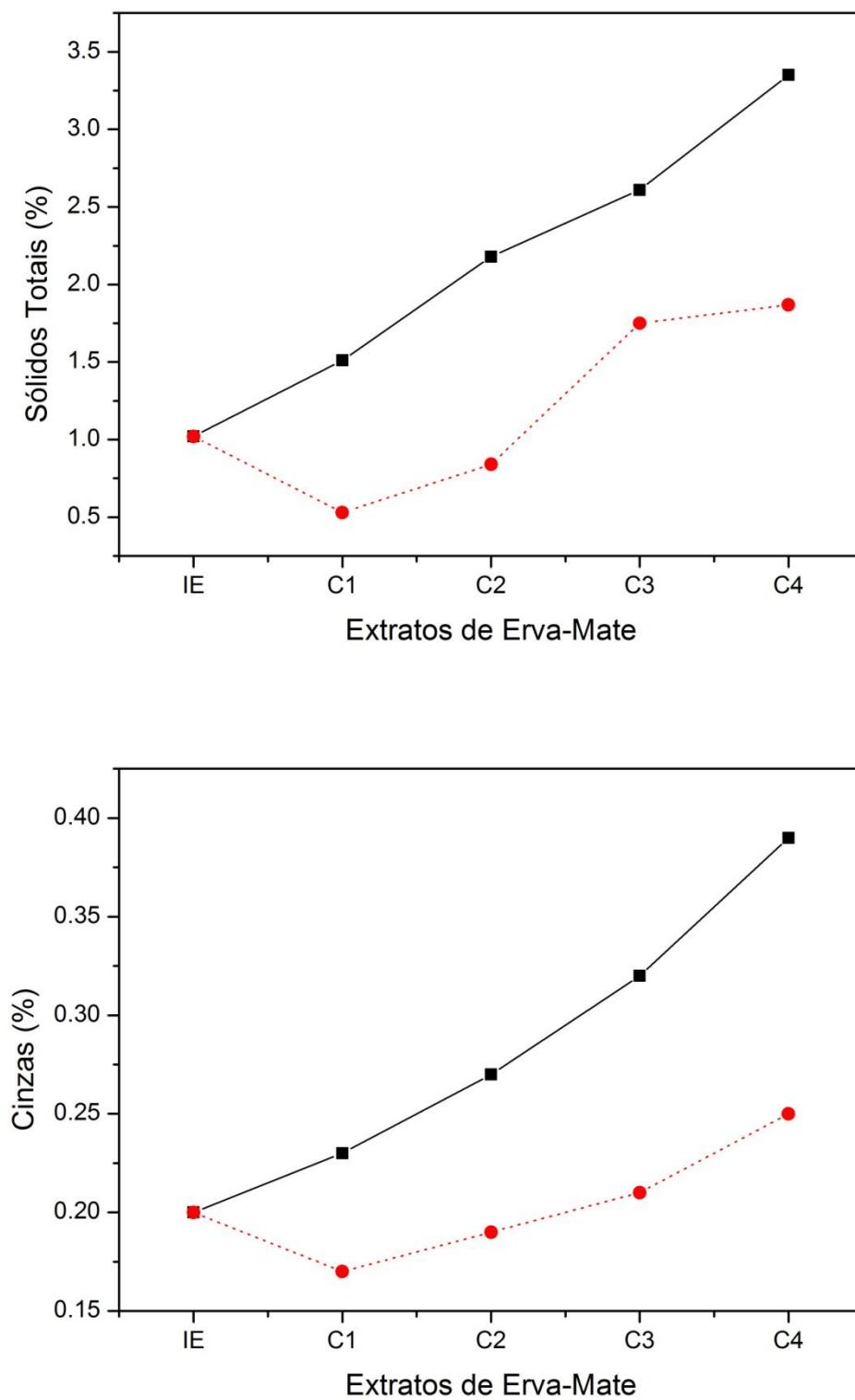
Tabela 3 – Teor de sólidos totais (ST), cinzas (C) e matéria orgânica (MO) do extrato de erva-mate inicial (EI) e dos gelos provenientes de cada estágio de crioconcentração

	ST (%)	C (%)	MO (%)
EI	$1,02 \pm 0,05^c$	$0,20 \pm 0,01^b$	$0,89 \pm 0,06^c$
G1	$0,53 \pm 0,01^e$	$0,17 \pm 0,04^b$	$0,36 \pm 0,02^e$
G2	$0,84 \pm 0,04^d$	$0,19 \pm 0,06^b$	$0,65 \pm 0,05^d$
G3	$1,75 \pm 0,08^b$	$0,21 \pm 0,02^b$	$1,53 \pm 0,02^b$
G4	$1,87 \pm 0,04^a$	$0,25 \pm 0,02^a$	$1,62 \pm 0,08^a$

Nota: Gelo do primeiro estágio de crioconcentração (G1), gelo do segundo estágio (G2), gelo do terceiro estágio (G3) e gelo do quarto estágio (G4). Médias com letras diferentes na coluna significam que são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($P < 0.05$).

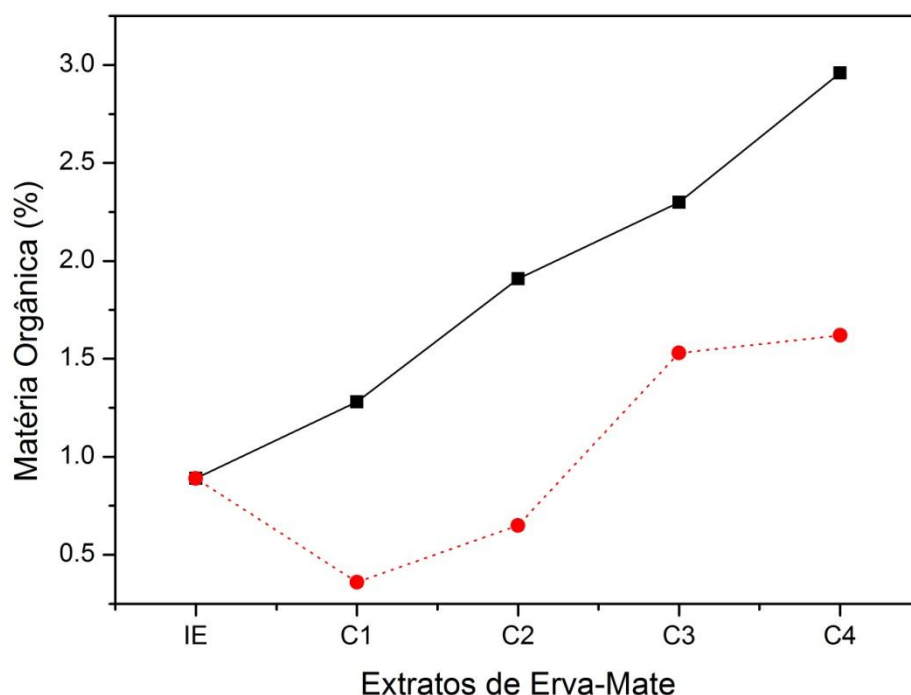
Na Figura 18 é visualizada a evolução do teor de ST, C e MO em função dos estágios de crioconcentração e dos respectivos gelos. Entre o estágio 1 e 2 da crioconcentração houve um aumento de 0,31 % do teor de ST no gelo e um aumento de 0,91 % entre os estágios 2 e 3. Na última etapa foi observado um aumento do teor de sólidos totais no gelo (0,12 %). De acordo com Aider e Ounis (2012), o aumento do teor de ST no gelo pode ser explicado pelo fato de que eles tendem a ficar retidos nas frações congeladas durante os estágios finais da crioconcentração. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Boaventura *et.al.* (2013), sugerindo que o processo de crioconcentração foi eficiente.

Figura 18 - Evolução do teor de sólidos totais e cinzas dos concentrados e dos gelos em função dos estágios da crioconcentração



Nota: A linha preta unida por quadrados (-■-) representa os teores presentes no extrato crioconcentrado e a linha vermelha unida por círculos (-●-) representa os teores presentes no gelo correspondente ao mesmo extrato crioconcentrado.

Figura 19 - Evolução do teor de matéria orgânica dos concentrados e dos gelos em função dos estágios da criocôncntração



Nota: A linha preta unida por quadrados (—■—) representa os teores presentes no extrato criocôncntrado e a linha vermelha unida por círculos (—●—) representa os teores presentes no gelo correspondente ao mesmo extrato criocôncntrado.

Na Tabela 4 são observados os valores do fator de concentração (FC) em cada etapa do processo de criocôncntração. O fator de concentração médio do teor de ST foi de 238 %, do teor de C foi de 157 % e de MO foi de 245 %.

Tabela 4 - Fator de concentração da criocôncntração

	Sólidos Totais (%)	Cinzas (%)	Matéria Orgânica (%)
EI ⇒ C1	149,47 ± 5,87 ^d	116,14 ± 0,28 ^d	158,06 ± 7,75 ^d
EI ⇒ C2	213,50 ± 3,21 ^c	153,20 ± 2,71 ^c	216,40 ± 4,88 ^c
EI ⇒ C3	255,26 ± 7,66 ^b	166,79 ± 3,65 ^b	271,10 ± 10,11 ^b
EI ⇒ C4	331,70 ± 14,09 ^a	191,28 ± 8,55 ^a	336,01 ± 19,07 ^a

Nota: Extrato inicial de erva-mate (EI), primeiro criocôncntrado (C1), segundo criocôncntrado (C2), terceiro criocôncntrado (C3) e quarto criocôncntrado (C4). Médias com letras diferentes na coluna significam que são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P<0.05).

Comparando o EI com o C4 para os teores de ST, cinzas e MO nos extratos de erva-mate, observa-se que os fatores de concentração aumentaram significativamente. O aumento

do teor de matéria orgânica foi o mais significativo, com um fator de concentração de 336,01 %. O menor fator de concentração foi o de cinzas (116,14 %). Já o maior fator de concentração dos ST foi de 331,70 %. No trabalho da Boaventura *et al.* (2013) o fator de concentração para os ST na quarta etapa de crioconcentração de ST foi de 479,6 %. Esta diferença do fator de concentração pode ter relação com a diferença entre os teores de ST inicial dos extratos deste trabalho (1,02 %) com os do trabalho que a Boaventura *et al.* (2013) obteve (0,70 %). A Eficiência do processo de crioconcentração é observada na Tabela 5, na qual o processo apresentou maior eficiência na primeira e segunda etapa.

Tabela 5 - Eficiência da crioconcentração em cada etapa do processo

	Sólidos Totais (%)	Cinzas (%)	Matéria Orgânica (%)
EI $\Rightarrow$ C1	66,01 $\pm$ 4,69 ^a	27,59 $\pm$ 4,12 ^b	73,24 $\pm$ 5,45 ^a
C1 $\Rightarrow$ C2	60,99 $\pm$ 3,57 ^b	49,31 $\pm$ 0,27 ^a	62,98 $\pm$ 4,12 ^b
C2 $\Rightarrow$ C3	32,23 $\pm$ 0,98 ^d	15,59 $\pm$ 1,39 ^c	34,79 $\pm$ 1,04 ^d
C3 $\Rightarrow$ C4	46,22 $\pm$ 6,15 ^c	25,21 $\pm$ 10,34 ^{bc}	48,95 $\pm$ 7,58 ^c

Nota: Extrato inicial de erva-mate (EI), primeiro crioconcentrado (C1), segundo crioconcentrado (C2), terceiro crioconcentrado (C3) e quarto crioconcentrado (C4). Médias com letras diferentes na coluna significam que são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P<0.05).

Nos estágios consecutivos, a eficiência do processo diminuiu quando comparada ao primeiro e segundo estágios (Tabela 5). De acordo com Belén *et al.* (2012), a eficiência da crioconcentração normalmente diminui em função da evolução dos estágios devido ao aumento da retenção de sólidos no gelo. Outros estudos reportaram declínio na eficiência entre 30 e 50 % nos estágios finais da crioconcentração (AIDER; DE HALLEUX; AKBACHE, 2007; AIDER; DE HALLEUX, 2008).

O melhor resultado de eficiência foi observado na primeira etapa (EI $\Rightarrow$ C1) para MO, onde o aumento foi de 73,24 %. Pode-se observar que a eficiência nas etapas de crioconcentração é melhor para os ST do que para o teor de C. Isto ocorre devido aos compostos que formam as cinzas serem mais solúveis na água e consequentemente são os que ficam no gelo.

5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DOS EXTRATOS DE ERVA-MATE

A determinação das concentrações das principais metilxantinas e polifenóis presentes no extrato inicial de erva-mate (EI) e nos extratos crioconcentrados de erva-mate, foram determinadas através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Nestas análises foram observados oito picos principais. Destes foram identificados cinco compostos na eluição, usando padrões e outros três picos foram considerados não identificados (Ni). A sequência dos picos foi à seguinte: teobromina, composto não identificado 1 (Ni 1), ácido 5-cafeoilquínico, composto não identificado 2 (Ni 2), cafeína, rutina, ácido 3,5-dicafeoilquímico e o composto não identificado 3 (Ni 3).

Na Tabela 6 são observados os teores das metilxantinas presentes no EI e crioconcentrados de erva-mate. A cafeína é a metilxantina presente em maior concentração nos extratos estudados. O aumento nas concentrações foi significativo até a segunda etapa de crioconcentração (C2), tanto para a teobromina como para a cafeína. Sendo assim, não seria necessário ter realizado o protocolo de crioconcentração até a quarta etapa para crioconcentrar as metilxantinas.

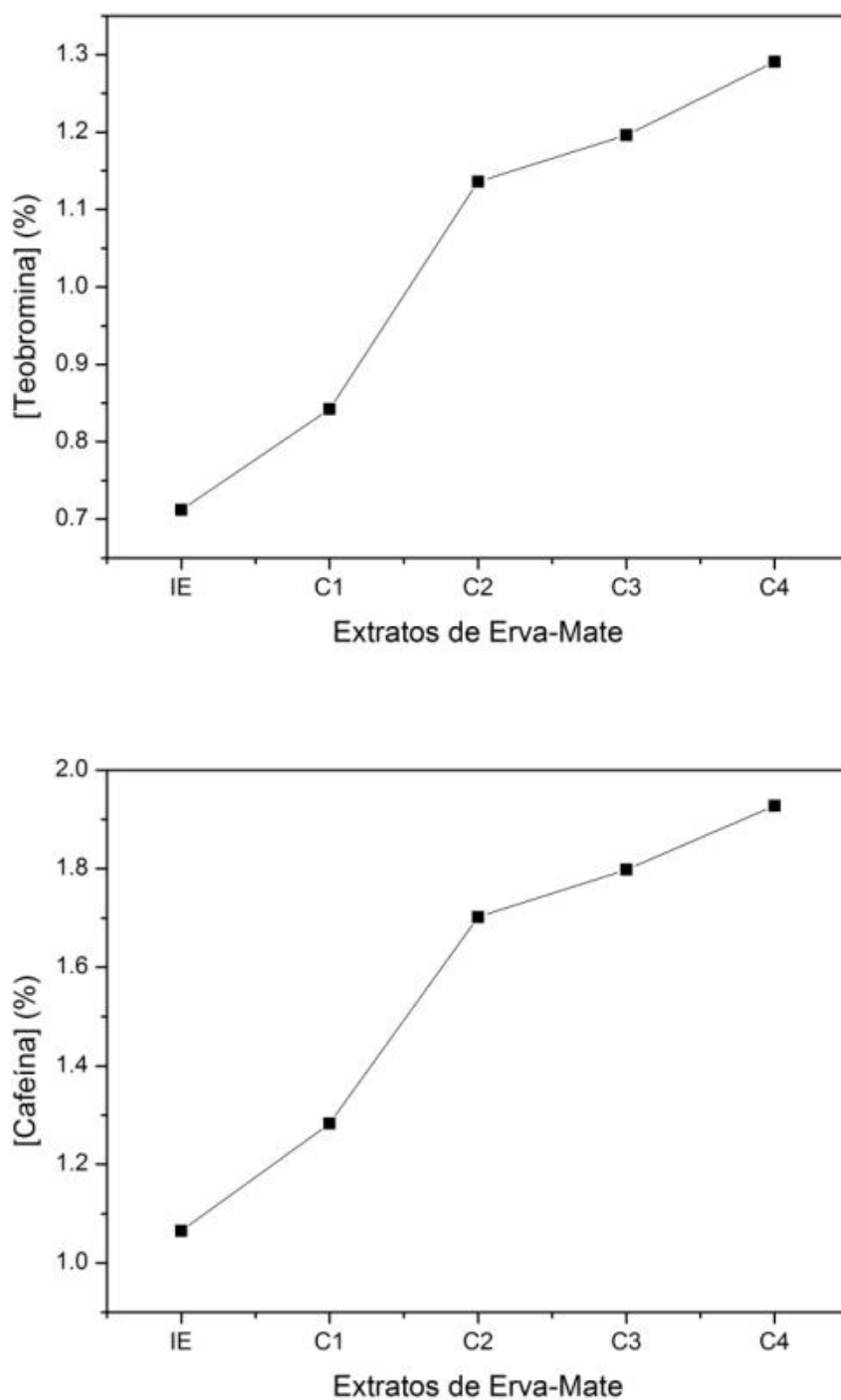
Tabela 6 - Teores das metilxantinas presentes nos extratos de erva-mate

	Teobromina (%)	Cafeína (%)
	TR = 27,998 ± 0,017 min	TR = 31,035 ± 0,012 min
EI	0,712 ± 0,030 ^b	1,065 ± 0,045 ^c
C1	0,842 ± 0,112 ^b	1,283 ± 0,169 ^b
C2	1,136 ± 0,126 ^a	1,702 ± 0,190 ^a
C3	1,196 ± 0,045 ^a	1,798 ± 0,067 ^a
C4	1,291 ± 0,114 ^a	1,928 ± 0,171 ^a

Nota: Teores em porcentagem massa/massa, Extrato inicial de erva-mate (EI), primeiro estágio de crioconcentração (C1), segundo estágio de crioconcentração (C2), terceiro estágio de crioconcentração (C3) e quarto estágio de crioconcentração (C4). Médias com letras diferentes na coluna significam que são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P < 0.05).

Nas análises da teobromina é observado que o extrato C2 diferiu estatisticamente do Extrato Inicial (EI). No entanto para a cafeína são observadas diferenças estatísticas entre EI, C1 e C2. Esta evolução nas concentrações da Teobromina e da Cafeína podem ser melhor observadas na Figura 20.

Figura 20 - Teores das metilxantinas presentes nos extratos de erva-mate



Nota: Teores em porcentagem massa/massa, Extrato inicial de erva-mate (EI), primeiro estágio de criocôncntração (C1), segundo estágio de criocôncntração (C2), terceiro estágio de criocôncntração (C3) e quarto estágio de criocôncntração (C4).

O teor dos compostos fenólicos isolados do extrato aquoso inicial de folhas de erva-mate e do concentrado de cada estágio da criocôncntração apresentou aumento significativo até a segunda etapa (Tabela 7).

Tabela 7 - Teores dos polifenóis e flavonóides presentes nos extratos de erva-mate

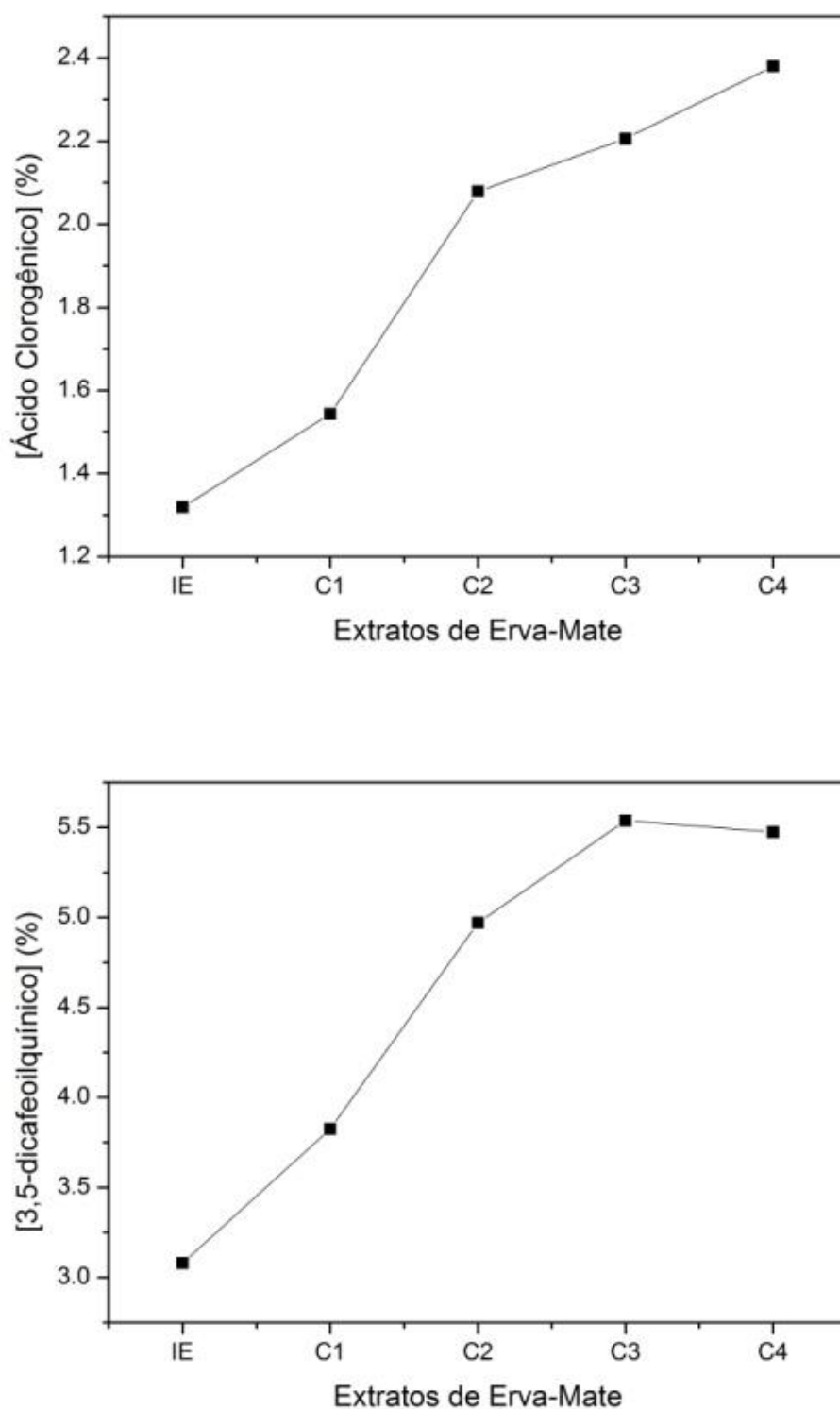
	Ácido 5-cafeoilquínico (%) TR = 30,013 ± 0,012 min	Ác. 3,5-dicafeoilquínico (%) TR = 47,872 ± 0,155 min	Rutina (%) TR = 37,266 ± 0,067 min
EI	1,319 ± 0,073 ^b	3,079 ± 0,144 ^c	0,352 ± 0,015 ^b
C1	1,543 ± 0,189 ^b	3,825 ± 0,527 ^b	0,409 ± 0,053 ^b
C2	2,079 ± 0,212 ^a	4,970 ± 0,598 ^a	0,572 ± 0,067 ^a
C3	2,206 ± 0,213 ^a	5,537 ± 0,262 ^a	0,588 ± 0,028 ^a
C4	2,380 ± 0,239 ^a	5,474 ± 0,524 ^a	0,645 ± 0,065 ^a

Nota: Teores em porcentagem massa/massa, polifenóis (ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico) e flavonóide (rutina), extrato inicial de erva-mate (EI), primeiro estágio de crioconcentração (C1), segundo estágio de crioconcentração (C2), terceiro estágio de crioconcentração (C3) e quarto estágio de crioconcentração (C4). Médias com letras diferentes na coluna significam que são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($P < 0.05$).

Os ácidos fenólicos identificados foram o ácido 5-cafeoilquínico e o ácido 3,5-dicafeoilquínico e o flavonóide identificado foi a rutina. Nas análises do ácido 5-cafeoilquínico e da rutina são observados que os extratos C2 diferiram estatisticamente do EI. No entanto para o ácido 3,5-dicafeoilquínico são observadas diferenças estatísticas entre os EI, C1 e C2.

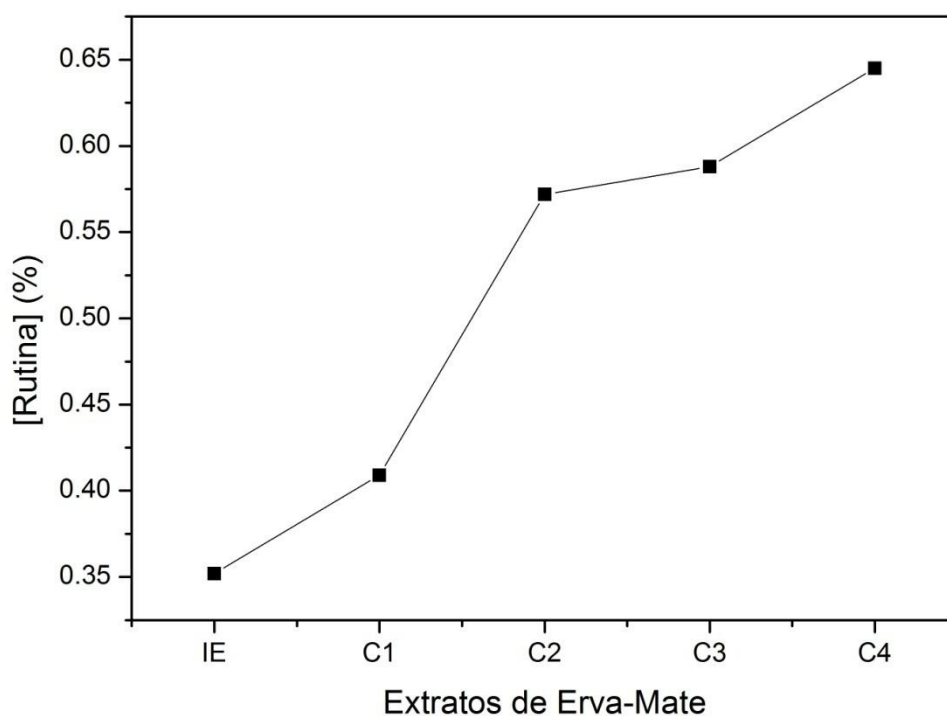
O ácido 5-cafeoilquínico e o ácido 3,5-dicafeoilquínico são os ácidos clorogênicos mais importantes presentes nos extratos de erva-mate e observou-se aumento significativo do teor destes entre o EI e o C2 (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; (MARQUES; FARAH, 2009). A rutina é o flavonóide de maior importância encontrado no extrato de erva-mate e neste estudo também apresentou aumento significativo entre o EI e o C2. Sendo assim, o processo de crioconcentração foi efetivo até a segunda etapa (C2). Após esta etapa não foi obtida significância estatística. Esta evolução nas concentrações do ácido 5-cafeoilquínico, do ácido 3,5-dicafeoilquínico e da rutina podem ser mais bem observadas na Figura 21.

Figura 21 - Teores dos polifenóis presentes nos extratos de erva-mate



Nota: Teores em porcentagem massa/massa dos polifenóis (ácido 5-cafeoilquinico (clorogênico), ácido 3,5-dicafeoilquinico), extrato inicial de erva-mate (EI), primeiro estágio de crioconcentração (C1), segundo estágio de crioconcentração (C2), terceiro estágio de crioconcentração (C3) e quarto estágio de crioconcentração (C4).

Figura 22 - Teores dos flavonóides presentes nos extratos de erva-mate



Nota: Teores em porcentagem massa/massa e do flavonóide (rutina), extrato inicial de erva-mate (IE), primeiro estágio de crioconcentração (C1), segundo estágio de crioconcentração (C2), terceiro estágio de crioconcentração (C3) e quarto estágio de crioconcentração (C4).

Na análise de CLAE foram observadas três espécies químicas que não foram identificadas com os padrões disponíveis. Tendo em vista que as análises foram realizadas no comprimento de onda de 280 nm acredita-se que sejam moléculas relacionadas a outros polifenóis ou com grupamentos químicos que permitam serem observados nesta faixa espectral. O comportamento destes compostos frente ao processo de crioconcentração ocorreu semelhante às metilxantinas e aos polifenóis (Tabela 8).

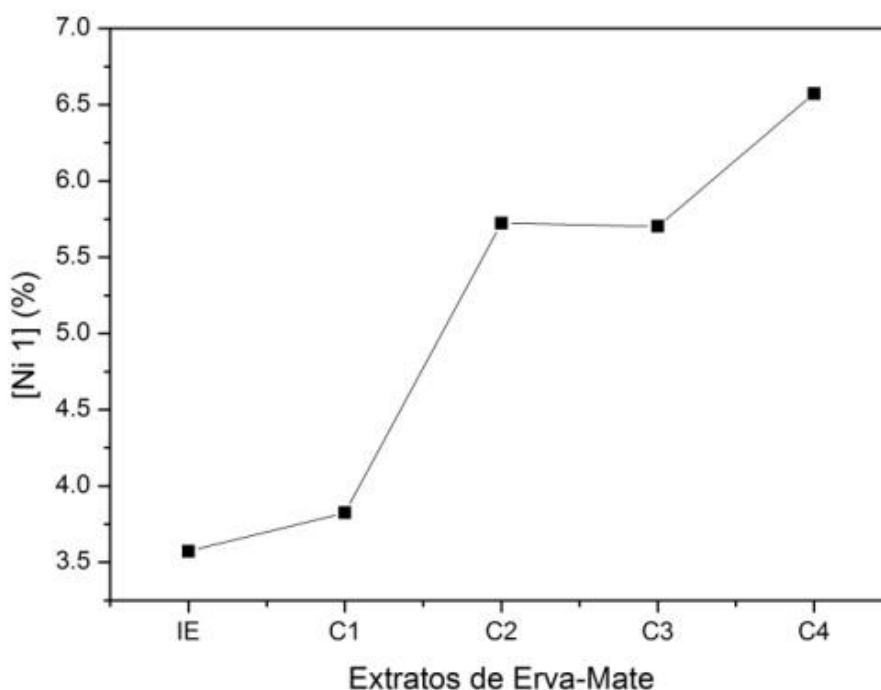
Tabela 8 - Teores dos compostos não identificados Ni 1, Ni 2 e Ni 3 nos extratos de erva-mate

	Ni 1 (%)	Ni 2 (%)	Ni 3 (%)
	TR = 28,669 ± 0,014 min	TR = 30,202 ± 0,011 min	TR = 52,279 ± 0,055 min
EI	3,572 ± 0,153 ^b	1,868 ± 0,066 ^b	0,712 ± 0,030 ^b
C1	3,825 ± 0,600 ^b	2,023 ± 0,323 ^b	0,842 ± 0,112 ^b
C2	5,724 ± 0,634 ^a	3,038 ± 0,363 ^a	1,136 ± 0,126 ^a
C3	5,703 ± 0,203 ^a	2,933 ± 0,261 ^a	1,196 ± 0,045 ^a
C4	6,573 ± 0,591 ^a	3,511 ± 0,300 ^a	1,291 ± 0,114 ^a

Nota: Teores em porcentagem massa/massa, extrato inicial de erva-mate (EI), primeiro estágio de criocôncntração (C1), segundo estágio de criocôncntração (C2), terceiro estágio de criocôncntração (C3) e quarto estágio de criocôncntração (C4). Médias com letras diferentes na coluna significam que são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P<0.05).

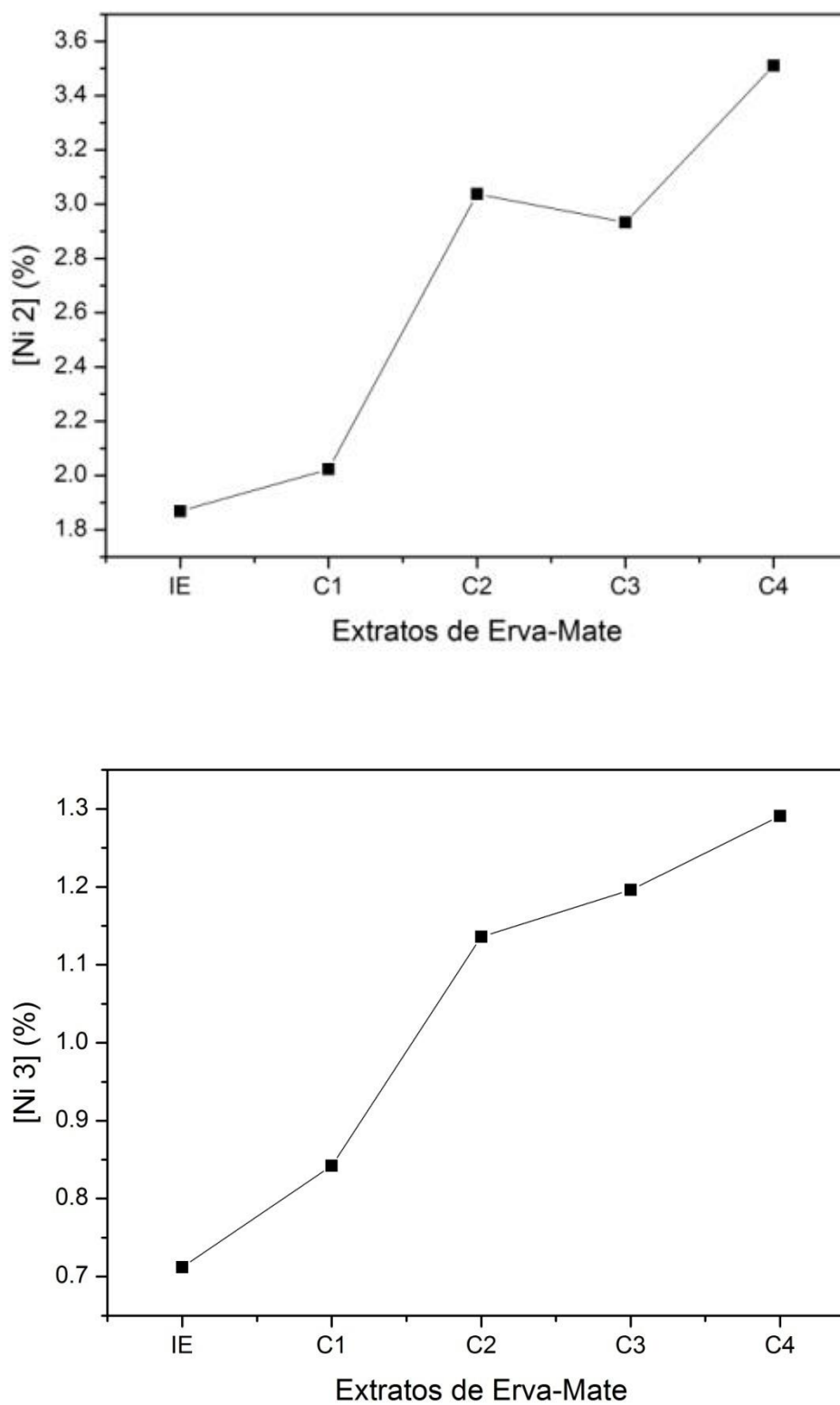
Nestas análises são observados que os extratos C2 diferiram estatisticamente do EI e podem ser melhor observadas na Figura 23 e Figura 24.

Figura 23 - Teores dos compostos não identificados Ni 1 nos extratos de erva-mate



Nota: Teores em porcentagem massa/massa, extrato inicial de erva-mate (EI), primeiro estágio de criocôncntração (C1), segundo estágio de criocôncntração (C2), terceiro estágio de criocôncntração (C3) e quarto estágio de criocôncntração (C4).

Figura 24 - Teores dos compostos não identificados Ni 2 e Ni 3 nos extratos de erva-mate



Nota: Teores em porcentagem massa/massa, extrato inicial de erva-mate (EI), primeiro estágio de criocentralização (C1), segundo estágio de criocentralização (C2), terceiro estágio de criocentralização (C3) e quarto estágio de criocentralização (C4).

Observou-se variação linear positiva e significativa no teor de todos os compostos fenólicos e metilxantinas analisados, entre o extrato inicial (EI) e o segundo estágio (C2) dos extratos de erva-mate. Sendo assim, o melhor nível de crioconcentração é a etapa 2, onde foi obtida a melhor extração dos compostos bioativos.

5.3 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE INCORPORAÇÃO POR ANÁLISE TÉRMICA

5.3.1 Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial (TG-DTA)

O processo de incorporação foi avaliado por análise termogravimétrica usando os resultados de TG-DTA em atmosfera de ar. Em todas as amostras foram observadas as primeiras perdas de massas com eventos endotérmicos que correspondes às perdas de umidade e compostos voláteis (Figura 25, Figura 26, Figura 27 e Figura 28).

Figura 25 - Curvas TG-DTA de amido de milho nativo (N) usando atmosfera de ar.

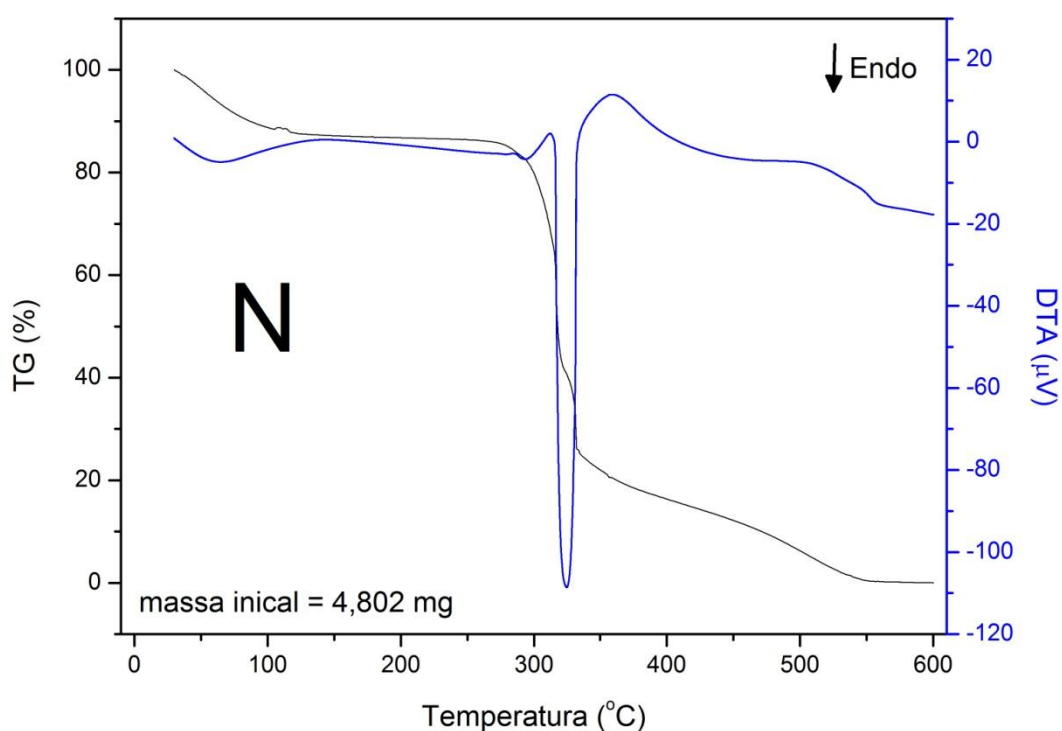


Figura 26 - Curvas TG-DTA de amidos de milho incorporados com extrato inicial de erva-mate (AEI) e com o extrato crioconcentrado da primeira etapa (AC1) usando atmosfera de ar.

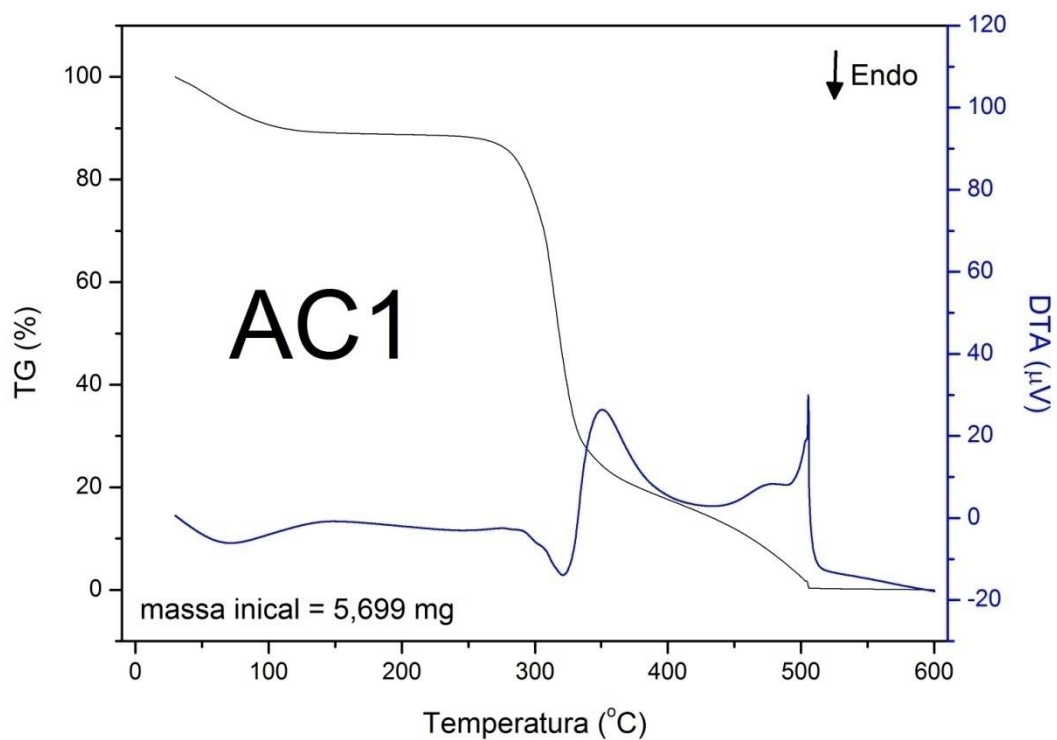
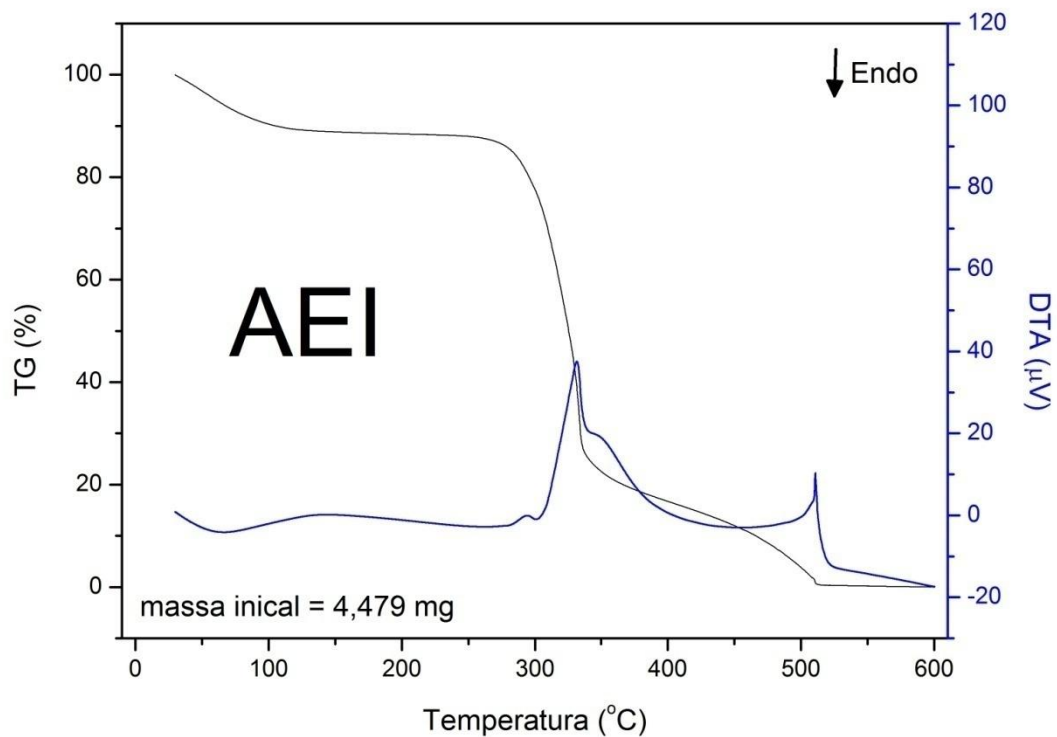


Figura 27 - Curvas TG-DTA de amido de milho incorporados com extratos de erva-mate crioconcentrados da segunda (AC2) e terceira etapas (AC3) usando atmosfera de ar.

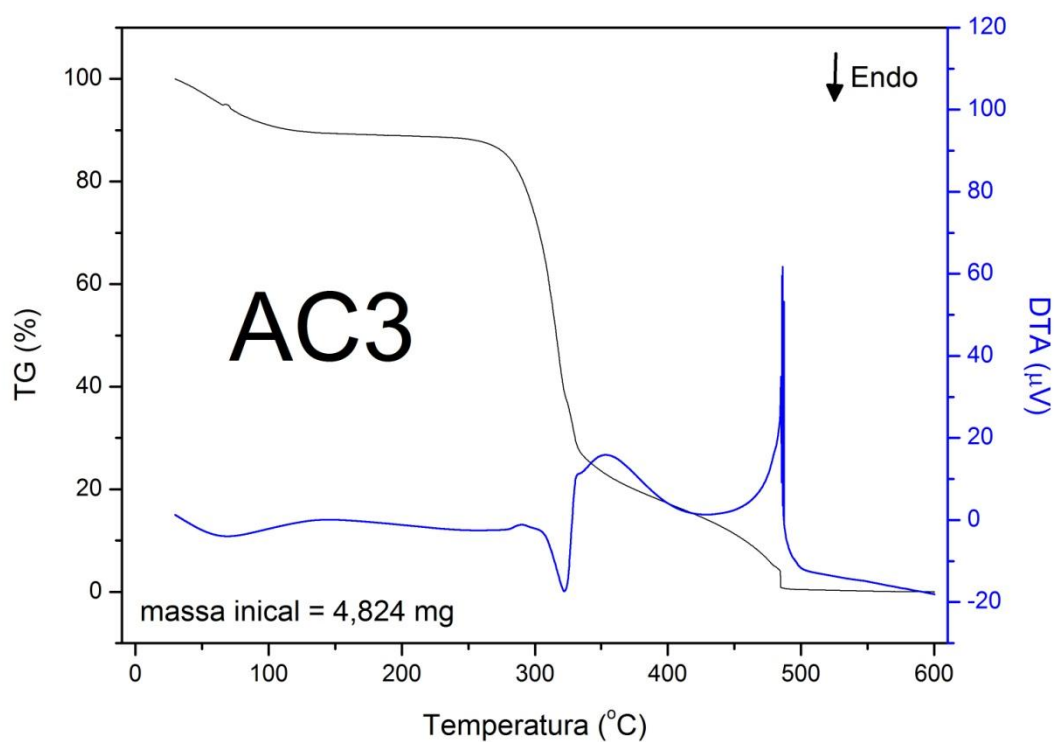
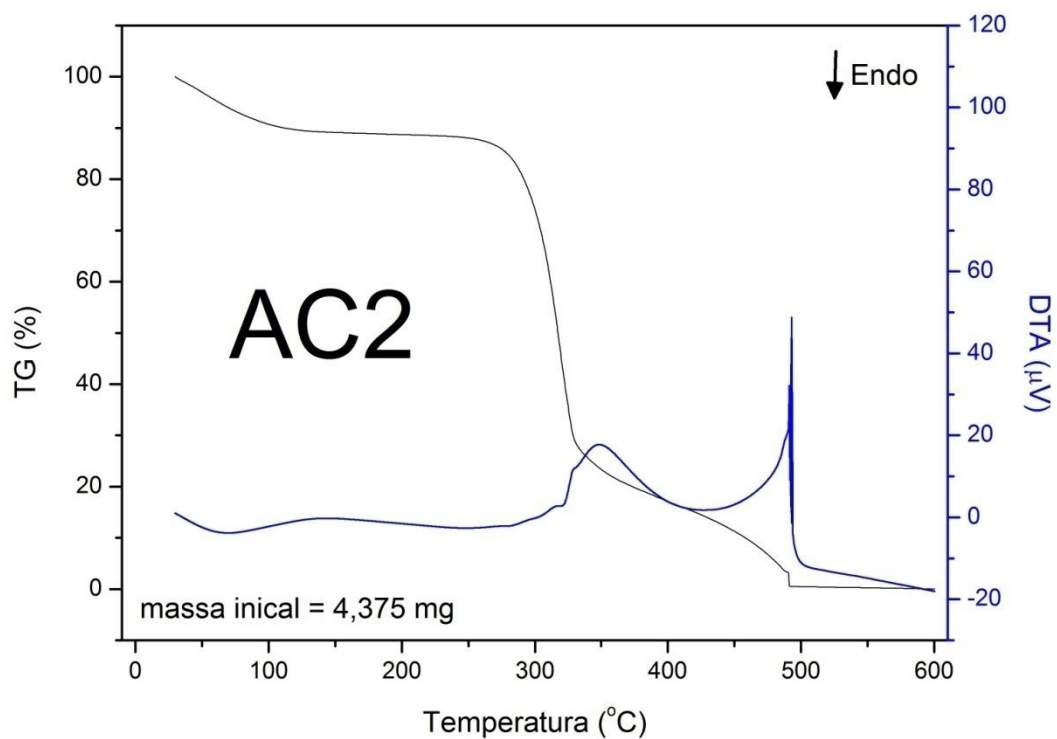
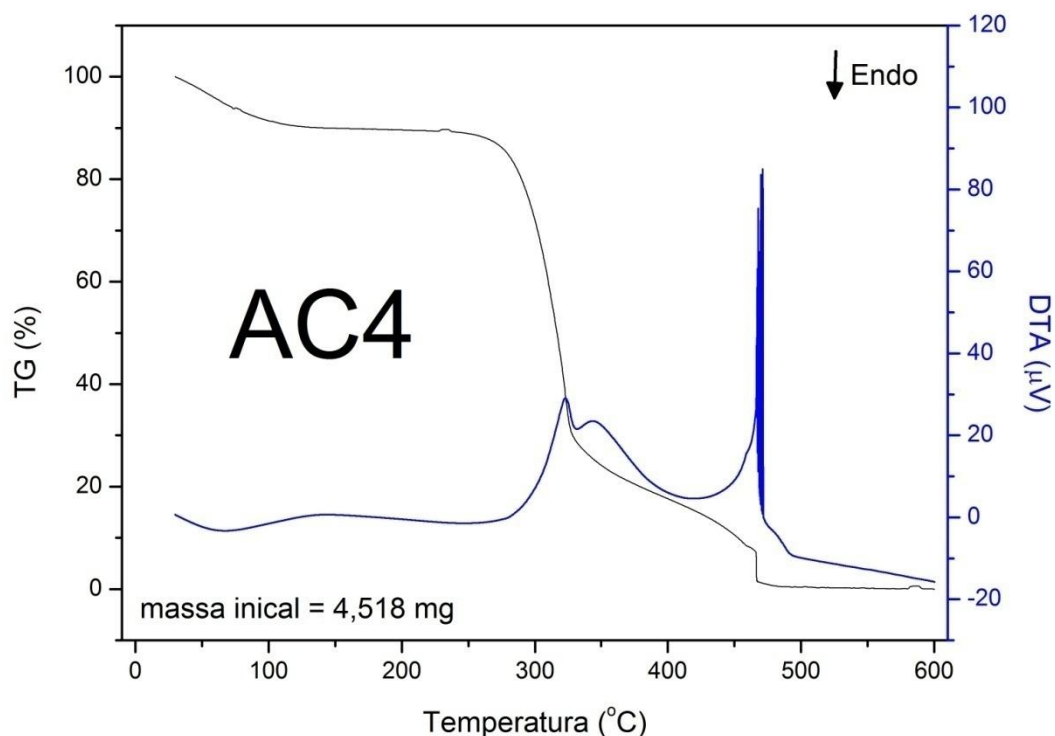


Figura 28 - Curvas TG-DTA de amido de milho incorporado com extratos de erva-mate crioconcentrados da quarta etapa (AC4) usando atmosfera de ar.



Como observado na Figura 25 após o primeiro evento há uma etapa de estabilidade térmica seguida pela segunda e terceira perdas de massas de forma consecutiva. Estas perdas de massas são referentes a decomposição e oxidação da matéria orgânica, respectivamente (AGGARWAL; DOLLIMORE, 1998; MALUCELLI *et al.*, 2015). A amostra nativa (N) apresentou resultados similares a trabalhos anteriores (BET *et al.*, 2016; HORNUNG *et al.*, 2016; HORNUNG *et al.*, 2019; SIQUEIRA *et al.*, 2017).

De acordo com a literatura, os amidos passam pelo processo de despolimerização quando a temperatura ultrapassa os 300 °C, em atmosfera oxidativa (AGGARWAL; DOLLIMORE, 1998). Observa-se na Figura 25 o processo endotérmico relacionado à despolimerização do amido presentes nas curvas EC1 e EC3. Os resultados (Tabela 9) mostram que os amidos incorporados com extratos de erva-mate apresentaram um aumento da intensidade dos eventos exotérmicos entre as temperaturas de 287 a 514 °C e consequentemente uma menor temperatura final de decomposição (TG).

Tabela 9 - Resultados de TG-DTA do amido nativo e dos amidos incorporados com extratos crioconcentrados de erva-mate

Amostras	TG		DTA	
	Etapas	Δm (%)	ΔT (°C)	T_p (°C)
N	1 ^a	10,8	30 – 118	65 (endo)
	Estabilidade	-	115 – 305	-
	2 ^a	64,2	306 – 333	325 (endo)
	3 ^a	24,3	333 - 383	360 (exo)
	Cinzas	0,7	492 - 556	531 (exo)
AEI	1 ^a	9,8	30 - 118	66 (endo)
	Estabilidade	-	118 – 296	-
	2 ^a	64,9	297 - 455	332 (exo)
	3 ^a	24,8	455 – 514	511 (exo)
	Cinzas	0,5		
AC1	1 ^a	9,7	30 - 123	72 (endo)
	Estabilidade	-	122 – 284	-
	2 ^a	60,2	285 – 336	321 (endo)
	3 ^a	29,6	336 – 433	351 (exo)
	Cinzas	0,5	433 – 504	505 (exo)
AC2	1 ^a	9,7	30 - 118	70 (endo)
	Estabilidade	-	118 – 287	-
	2 ^a	58,1	288 – 428	348 (exo)
	3 ^a	31,8	428 – 494	493 (exo)
	Cinzas	0,4		
AC3	1 ^a	9,9	30 - 122	69 (endo)
	Estabilidade	-	120 – 291	-
	2 ^a	59,9	292 – 338	322 (endo)
	3 ^a	29,8	338 – 430	353 (exo)
	Cinzas	0,4	430 – 488	486 (exo)
AC4	1 ^a	9,7	30 - 119	68 (endo)
	Estabilidade	-	118 – 286	-
	2 ^a	60,0	287 – 419	323 (exo)
	3 ^a	29,9	419 – 472	471 (exo)
	Cinzas	0,4		

Nota: amido de milho nativo (N); amido incorporado com extrato inicial de erva-mate (AEI); amido incorporado com o extrato crioconcentrado de erva-mate da primeira etapa (AC1); amido incorporado com o extrato crioconcentrado de erva-mate da segunda etapa (AC2); amido incorporado com o extrato crioconcentrado de erva-mate da terceira etapa (AC3); amido incorporado com o extrato crioconcentrado de erva-mate da quarta etapa. (AC4), perda de massa (Δm), variação de temperatura (ΔT), temperatura de pico (T_p)

As amostras de amido de milho incorporadas com extratos de erva-mate apresentam compostos bioativos inseridos na sua estrutura, pois possuem um comportamento térmico diferenciado do amido nativo (N). Na Figura 25 a liberação de maior energia em temperaturas mais altas (reação exotérmica), isso ocorre provavelmente devido ao aumento de oxigênio proveniente dos compostos bioativos inseridos na estrutura do amido. Também é observado um aumento na intensidade dos eventos exotérmicos com o avanço da etapa de crioconcentração (Figura 25). Estes resultados indicam que os compostos oxigenados da erva-mate (polifenóis, flavonoides, amino ácidos, xantinas e alcalóides) foram incorporados nos amidos e corroboram com os resultados da CLAE.

Os teores de cinzas determinadas destas amostras de amido incorporadas com extratos de erva-mate apresentaram diferenças relacionadas ao extrato usado. Estes resultados foram de 0,7% para a amostra de amido de milho nativo, 0,5% para o amido incorporado com o extrato inicial de erva-mate e de 0,5%, 0,4%, 0,4% e 0,4% para as amostras incorporadas com os extratos crioconcentrados de erva-mate C1, C2, C3 e C4, respectivamente. Os teores de cinzas determinados apresentaram-se semelhantes a trabalho anteriores (OLIVEIRA *et al.*, 2014). A temperatura final de decomposição das amostras foi deslocada para temperaturas mais baixas de acordo com o avanço da etapa do extrato crioconcentrado C1 e C4 (531 – 471 °C). Este processo pode estar relacionado à presença de oxigênio nas amostras incorporadas, sendo assim, o aumento da concentração de oxigênio diminui a temperatura.

5.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Através da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram avaliadas as propriedades de gelatinização dos amidos de milho incorporados com extratos crioconcentrados de erva-mate. Os valores dos parâmetros analisados (T_o , T_p , T_c , ΔH) estão apresentados na Tabela 10.

As temperaturas iniciais de gelatinização (T_o) dos amidos com incorporação dos extratos crioconcentrados de erva-mate foram semelhantes ao do amido nativo (N). Apenas a amostra (AC2) apresentou um valor menor de T_o . Todas as amostras apresentaram valores de T_p semelhantes. Nas temperaturas de conclusão (T_c) são observadas que as amostras AEI, AC1 e AC2 apresentaram valores maiores do que do amido nativo, enquanto as amostras AC3 e AC4 obtiveram valores menores. A entalpia de gelatinização (ΔH) aumentou nas amostras de amido de milho tratadas com extrato crioconcentrado de erva-mate, sendo que a amostra (AC1) apresentou o menor valor de entalpia comparado ao amido nativo (N). Estes resultados

foram semelhantes a outros trabalhos que observaram que a adição de compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, lignanas e estilbenos) altera as propriedades térmicas dos amidos e aumenta a entalpia de gelatinização destes (ZHU *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2009; ZHU e WANG 2012). A entalpia de gelatinização permite entender qual é a energia necessária para que ocorra o entumescimento dos grânulos devido à elevação da temperatura de gelatinização e absorção de água (WEBER *et al.*, 2009).

Tabela 10 - Resultados da análise de DSC para o amido nativo e incorporados com extratos crioconcentrados de erva-mate

Amostras	To/°C	Tp/°C	Tc/°C	$\Delta H_{gel}/J\ g^{-1}$
N	65,8	70,1	74,8	5,3
AEI	66,0	70,6	77,0	5,9
AC1	65,3	70,3	76,1	5,8
AC2	63,5	69,8	76,6	6,5
AC3	65,9	70,0	73,8	6,9
AC4	65,7	70,2	74,4	7,6

Nota: amido de milho nativo (N); amido incorporado com extrato inicial de erva-mate (AEI); amido incorporado com o extrato crioconcentrado de erva-mate da primeira etapa (AC1); amido incorporado com o extrato crioconcentrado de erva-mate da segunda etapa (AC2); amido incorporado com o extrato crioconcentrado de erva-mate da terceira etapa (AC3); amido incorporado com o extrato crioconcentrado de erva-mate da quarta etapa (AC4); temperatura inicial (T_o); temperatura de pico (T_p); temperatura de conclusão (T_c); entalpia de gelatinização (ΔH_{gel}).

A crioconcentração de extratos de erva-mate gera uma solução rica em compostos bioativos que alteram as propriedades térmicas do amido de milho (ZHU *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2009; ZHU e WANG 2012).

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que é possível aumentar o teor dos sólidos totais (ST), da matéria orgânica (MO) e dos compostos bioativos, presentes no extrato aquoso de erva-mate através da técnica de crioc Concentração por blocos completa. E que este processo proporciona a produção de extratos aquosos de erva-mate com potencial qualidade nutricional elevada podendo ser aplicada para o uso humano.

O processo de crioc Concentração apresentou fatores de concentração (FC) e eficiências (E) semelhantes aos relatados na literatura. Os fatores de concentração aumentaram significativamente com o aumento das etapas da crioc Concentração, tanto para ST, C e MO. A primeira e a segunda etapas do processo mostraram-se mais eficientes.

Nas análises de CLAE foi observado que as metilxantinas (cafeína e a teobromina) aumentaram significativamente entre o EI e o C2. O mesmo foi observado para os polifenóis (ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e a rutina).

As incorporações dos extratos de erva-mate nas amostras de amido de milho foram confirmadas através da análise térmica. Nas curvas TG-DTA foi possível observar o aumento da intensidade dos eventos exotérmicos com o avanço das etapas de crioc Concentração. Isto mostra que houve aumento nos índices de oxigênio presentes nas amostras analisadas de amidos incorporados com extratos de erva-mate. Estes resultados indicaram que compostos oxigenados (polifenóis e metilxantinas) foram incorporados nos amidos.

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) mostrou que as amostras de amido de milho incorporadas com extratos de erva-mate crioc Concentrados tiveram os valores de entalpia de gelatinização (ΔH) aumentados em todos os estágios da crioc Concentração. E a temperatura de pico (T_p) das amostras apresentou valores semelhantes e a temperatura de conclusão (T_c) as amostras de amido de milho incorporado com EI, C1 e C2 apresentaram valores aumentados. Estes resultados demonstram que os extratos crioc Concentrados de erva-mate foram incorporados no amido de milho, pois alteraram as propriedades térmicas dos amidos.

Neste estudo, usando métodos termoanalíticos e cromatográficos, foi possível concluir que o processo de incorporação dos bioativos de extratos crioc Concentrados de erva-mate em amido de milho é efetivo.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL P, DOLLIMORE D. A thermal analysis investigation of partially hydrolyzed starch. **Thermochimica Acta**, v. 319, p.17-25, 1998.
- AIDER, M.; DE HALLEUX, D.; AKBACHE, A. Whey cryoconcentration and impact on its composition. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 92-102, 2007.
- AIDER, M.; DE HALLEUX, D. Passive and microwave-assisted thawing in maple sap cryoconcentration technology. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 65-72, 2008.
- AIDER, M.; DE HALLEUX, D. Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications. **LWT- Food Science and Technology**, v. 42, p. 679-685, 2009.
- AIDER, M.; OUNIS, W. B. Skim milk cryoconcentration as affected by the thawing mode: gravitational vs. microwave-assisted. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 195-202, 2012.
- AOAC. Official Methods of Analysis. **The Association of Official Analytical Chemists International**. 20.ed. Gaithersburg, Maryland, 2016.
- BASTOS, D. H. M.; OLIVEIRA, D. M.; MATSUMOTO, R. L. T.; CARVALHO, P. O.; RIBEIRO, M. L. *Yerba maté*: pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 1, p. 37-46, 2007.
- BASSANI, D. C.; NUNES, D. S.; GRANATO, D. Optimization of phenolics and flavonoids extraction conditions and antioxidant activity of roasted yerba-mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using response surface methodology. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 86, n. 2, p. 923–933, 2014.
- BELÉN, F.; SÁNCHEZ, J.; HERNÁNDEZ, E.; AULEDA, J. M.; RAVENTÓS, M. One option for the management of wastewater from tofu production: Freeze concentration in a falling-film system. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 3, p. 364-373, 2012.
- BENINCA, C.; COLMAN, T. A. D.; LACERDA, L. G.; FILHO, M. A. S. C.; DEMIATE, I. M.; BANNACH, G.; SCHNITZLER, E. Thermal, rheological and structural behavior of natural and modified cassava starch granules, with sodium hypochlorite solutions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, p. 2217–2222, 2013.
- BERTÉ, K.; RUCKER, N.; HOFFMANN-RIBANI, R. Yerba maté *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. **Phytothérapie**, v. 9, p. 180-184, 2011.
- BET, C. D.; CORDOBA, L. P.; RIBEIRO, L. S.; SCHNITZLER, E. Common vetch (*Vicia sativa*) as a new starch source: its thermal, rheological and structural properties after acid hydrolysis. **Food Biophys**, v. 11, n. 3, p. 275- 282, 2016.
- BICUDO, S. C. W.; DEMIATE, I. M.; BANNACH, G.; LACERDA, L. G.; FILHO, M. A. S. C.; IONASHIRO, M.; SCHNITZLER, E. Thermoanalytical study and characterization of

native starches of Paraná pine seeds (*Araucaria angustifolia*, Bert O, Ktze) and European chestnut seeds (*Castanea sativa*, Mill). **Eclética Química**, v. 34, n.1, p. 7-12, 2009.

BOAVENTURA, B. C. B.; DI PIETRO, P. F.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G. A.; DE MORAIS, E. C.de.; ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; SILVA, E. L. da. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, p. 657-664, 2012.

BOAVENTURA, B. C. B.; MURAKAMI, A. N. N.; PRUDÊNCIO, E. S.; MARASCHIN, M.; MURAKAMI, F. S.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. 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.; SOUZA, E. L.; LU, R. H.; PRUDÊNCIO, E. S. ; PIETRO, P. F.; BECKER, A. M.; AMBONI, R. D. M. C.. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) infusion obtained by freeze concentration technology on antioxidant status of healthy individuals. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie / Food Science Technology**, v. 62, p. 948-954, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Farmacopéia brasileira 6^a edição. **Diário Oficial da União** nº 156, Brasília, 14 de agosto de 2019.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, n. 3, p. 303-405, abr. 2007.

CEBALLOS, R. L.; OCHOA-YEPES, O.; GOYANES, S.; BERNAL, C.; FAMÁ, L. Effect of yerba mate extract on the performance of starch films obtained by extrusion and compression molding as active and smart packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 244, p. 1-12, 2020.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F.; TAKAHASHI, M. Balança hidrostática como forma de avaliação do teor de massa seca e amido. In: CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. **Tecnologias, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, p. 711, 2003.

CHAI, Y., WANG, M., ZHANG, G. Interaction between amylose and tea polyphenols modulates the postprandial glycemic response to high-amylose maize starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.61, p. 8608 - 8615, 2013.

CHEOK, C. Y.; SALMAN, H. A. K.; SULAIMAN, R. Extraction and quantification of saponins: A review. **Food Research International**, v. 59, p. 16-40, 2014.

CHIANESE, G.; GOLIN-PACHECO, S. D.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; COLLADO, J. A.; MUNOZ, E.; APPENDINO, G.; POLLASTRO, F. Bioactive triterpenoids from the caffeine-rich plants guayusa and mate. **Food Research International**, v. 115, p. 504-510, 2019.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2007.

COLPO, A. C.; ROSA, H.; LIMA, M. E.; PAZZINI, C. E. F.; DE CAMARGO, V. B.; BASSANTE, F. E. M.; PUNTEL, R.; ÁVILA, D. S.; MENDEZ, A.; FOLMER, V. 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.

DAMIANI, E.; BACCHETTI, T.; PADELLA, L.; TIANO, L.; CARLONI, P. Antioxidant activity of different white teas: Comparison of hot and cold tea infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, p. 50-66, 2014.

DELADINO, L.; ANBINDER, P. S.; NAVARRO, A. S.; MARTINO, M. N. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 126-134, 2008.

DELADINO, L.; TEIXEIRA, A. S.; NAVARRO, A. S.; ALVAREZ, I.; MOLINA-GRACÍA, A. D.; MARTINO, M. Corn starch system as carrier for yerba mate (*Ilex paraguariensis*) antioxidants. **Journal Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 463-472, 2015.

MEJÍA, E. G.; SONG, Y. S.; HECK, C. I.; RAMÍRES-MARES, M. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.

MORAIS, E. C. de.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G. A.; BOAVENTURA, B. C. B.; DE ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; DI PIETRO, P. F.; MARASCHIN, M.; SILVA, E. L. da. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8316-8324, 2009.

ELEKOFEHINTI, O. O. Saponins: Anti-diabetic principles from medicinal plants – A review. **Pathophysiology**, v. 22, n. 2, p. 95-103, 2015.

FAGGION, H.; TUSSOLINI, L.; FREIRE, F. B.; FREIRE, J. T.; ZANOELO, E. F. Mechanisms of heat and mass transfer during drying of mate (*Ilex paraguariensis*) twigs. **Drying Technology**, v. 34, n. 4, p. 474-482, 2016.

FENNEMA, O. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acríbia, 2000.

FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO, L. J. C. B.; LEONEL, M.; VILPOUX, O. F.; SARMENTO, S. B. S. **Propriedades gerais do amido**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002.

GERKE, I. B. B.; HAMERSKI, F.; SCHEER, A. P.; SILVA, V. R. Clarification of crude extract of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) by membrane processes: Analysis of fouling and loss of bioactive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 102, p. 204-212, 2017.

GNOATTO, S. C. B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex Paraguariensis* aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 723-726, 2005.

GUO, Q.; SUN, D.; CHENG, J.; HAN, Z. Microwave processing techniques and their recent applications in the food industry. **Trends and Food Science & Technology**, v. 67, p. 236-247, 2017.

GUZAR, I.; RAGAE, S.; SEETHARAMAN, K. Mechanism of hydrolysis of native and cooked starches from different botanical sources in the presence of tea extracts. **Journal of Food Science**, v. 77, p.1192-1196, 2012.

HANSEL, F. A.; DOMINGOS, D. M.; LIMA, K. M. G.; PASQUINI, C. Moagem e sapeco/secagem em forno de microondas na classificação sensorial de erva-mate no infravermelho próximo. **Comunicado Técnico Embrapa Florestas**, v. 203, 2008.

HECK, C. I.; MEJÍA, E. G.de. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n.9, p. 138-151, 2007.

HEMINE, K. , SKWIERAWSKA, A. , KLEIST, C.; OLEWNICZAK, M.; SZWARC-KARABYKA, K.; WYRZYKOWSKI, D.; MIESZKOWSKA, A.; CHOJNACKI, J.; CZUB, J.; NIERZWICKI, L. Effect of chemical structure on complexation efficiency of aromatic drugs with cyclodextrins: The example of dibenzazepine derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 250, p. 1-12, 2020.

HENRÍQUEZ, C.; ESCOBAR, B.; FIGUEROLA, F.; CHIFFELLE, I.; SPEISKY, H.; ESTÉVEZ, A. M. Characterization of piñon seed (*Araucaria araucana* (Mol) K, Koch) and the isolated starch from the seed. **Food Chemistry**, v. 107, p. 592-601, 2008.

HERNÁNDEZ, E.; RAVENTÓS, M.; AULEDA, J. M.; IBARZ, A. Concentration of apple and pear juices in a multi-plate freeze concentrator. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 3, p. 348-355, 2009.

HERNÁNDEZ, E.; RAVENTÓS, M.; AULEDA, J. M.; IBARZ, A. Freeze concentration of must in a pilot plant falling film cryoconcentrator. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 130-136, 2010.

HORNUNG, P. S.; OLIVEIRA, C. S.; LAZZAROTTO, M.; LAZZAROTTO, S. R. S.; SCHNITZLER, E. Investigation of the photo-oxidation of cassava starch granules. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.123, p. 2129-2137, 2016.

HORNUNG, P. S.; LAZZAROTTO, S. R. S.; BELLETTINI, M. B.; LAZZAROTTO, M.; BETA, T.; RIBANI, R. H.; SCHNITZLER, E. Novel Oxidized and UV-Irradiated *Araucaria angustifolia* Pine Seed Starch for Enhanced Functional Properties. **Starch-Stärke**, v. 71, p. 1-10, 2019.

HORNUNG, P. S.; ÁVILA, S.; APEA-BAH, F. B.; LIU, J.; TEIXEIRA, G. L.; RIBANI, R. H.; BETA, T. Sustainable Use of *Ilex paraguariensis* Waste in Improving Biodegradable Corn Starch Films' Mechanical, Thermal and Bioactive Properties. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, p. 1696–1709, 2020.

HU, G.; CHEN, J.; GAO, J. Preparation and characteristics of oxidized potato starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 291-298. 2009.

IBGE. **Produção da extração vegetal e silvicultura**, 2018. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289>. Acesso em: 07 ago. 2020.

IONASHIRO M.; CAIRES F. J.; GOMES D. J. C. **Giolito: Fundamentos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial / Calorimetria Exploratória Diferencial**. 2 ed. São Paulo: Giz Editorial, 2014.

ISOLABELLA, S.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, p. 695-699, 2010.

JACQUES, R. A.; ARRUDA, E.J.; OLIVEIRA, L.C.S.; OLIVEIRA, A.P.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V.; CARAMÃO, E.B. Influence of agronomic variables on the macronutrient and micronutrient contents and thermal behavior of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 7510-7516, 2007.

JARAMILLO, C., M.; SELIGRA, P., G.; GOYANES, S.; BERNAL, C.; FAMÁ, L. Biofilms based on cassava starch containing extract of yerba mate as antioxidant and plasticizer. **Starch/Stärke**, v. 67, n. 9-10, p. 780-789, 2015.

JARAMILLO, C. M.; GUTIÉRREZ, T. J.; GOYANES, S.; BERNAL, C.; FAMÁ, L. Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 150-159, 2016.

JENSEN, S.; ZANOELO, E. F. Kinetics of Aqueous Extraction of Mate (*Ilex paraguariensis*) Leaves. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n. 2, p. 220-227, 2013.

JOBLING, S. Improving starch for food and industrial applications. **Plant Biotechnology**, v.7, p.210 – 218, 2004.

KASSUIA, Y. S.; SILVEIRA, A. C.; DOMAHOVSKI, R. C.; LAZZAROTTO, M. Aprimoramento e adaptação de método prático e rápido para estimar a quantidade de saponinas em extratos de polpa de frutos de erva-mate. Colombo: **Embrapa Florestas**, 2019. 10 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 436).

KNAPP, M. A.; SANTOS, D. F.; PILATTI-RICCIO, D.; DEON, V. G.; SANTOS, G. H. F.; PINTO, V. Z. Yerba mate extract in active starch films: Mechanical and antioxidant properties. **Journal of Food Processing Preservation**, v. 43, p. 1-12, 2019.

LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. **Carbohidratos en Alimentos Regionales Iberoamericanos**. São Paulo: EDUSP, 2006. 646 p.

LAZZAROTTO, S. R. S.; BET, C. D.; HORNUNG, P. S.; LAZZAROTTO, M.; SCHNITZLER, E. Induced effects by oxidation with potassium permanganate on the thermal, morphological, colorimetric and pasting properties of corn starch. **Ukrainian Food Journal**. v. 6, p. 197-210, 2017.

LAZZAROTTO, S. R. S.; LAZZAROTTO, M.; SILVEIRA, A. C.; WENDLING, I.; SCHNITZLER, E. Corn starch incorporated with freeze-concentrated *Ilex paraguariensis*

extracts: a potential nutraceutical product. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 141, p. 1-6, 2020.

LEONEL, M.; CARMO, E. L.; LEONEL S.; FRANCO, C. M. L.; CAMPANHA, R. B. Extração e caracterização do amido de diferentes genótipos de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 3, p. 599-605, 2011.

LIU, Q. Understanding Starches and Their Role in Foods. In: CUI, S. W. (ed) **Food Carbohydrates: chemistry, physical properties and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2005.

LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. **Carbohydrate polymers**, v. 95, p. 315-323, 2013.

LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Release of yerba mate antioxidants from corn starch–alginate capsules as affected by structure. **Carbohydrate polymers**, v. 99, p. 150-157, 2014.

LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; ESTEVEZ-ARECO, S.; GOYANES, S. Potato starch-based biocomposites with enhanced thermal, mechanical and barrier properties comprising water-resistant electrospun poly (vinyl alcohol) fibers and yerba mate extract. **Carbohydrate polymers**, v. 215, p. 377-387, 2019.

MACHADO, B. A. S.; NUNES, I. L.; PEREIRA, F. V.; DRUZIAN, J. I. Desenvolvimento e avaliação da eficácia de filmes biodegradáveis de amido de mandioca com nanocelulose como reforço e com extrato de erva-mate como aditivo antioxidante. **Revista Ciencia Rural**, vol.42, n.11, p.2085-2091, 2012.

MALUCELLI, L. C.; LACERDA, L. G.; CARVALHO-FILHO, M. A. S.; FERNÁNDEZ, D. E. R.; DEMIATE, I. M.; OLIVEIRA, C. S.; SCHNITZLER, E. Porous waxy maize starch. Thermal, structural and viscographic properties of modified granules obtained by enzyme treatment. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, p. 525-532, 2015.

MANINGAT, C. C.; SEIB, P. A.; BASSI, S. D.; WOO, K. S.; LASATER, G. D. Wheat Starch: Production, Properties, Modification and Uses. In: BEMILLER, J. e WHISTLER, R. **Starch: Chemistry and Technology**, p. 441-510, 2009.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370- 1376, 2009.

MEINHART, A. D.; BIZZOTTO, C. S.; BALLUS, C. A.; RYBKA, A. C. P.; SOBRINHO, M. R.; CERRO-QUINTANA, R. S.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H. T. Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2188-2193, 2010.

MEJÍA, E. G. de.; SONG, Y. S.; HECK, C. I.; RAMIREZ-MARES, M. V. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 23-34, 2010.

MELO, S. S.; NUNES, NILO, S. I.; BAUNGARTEN, C. ; TRESSOLDI, C. ; FACCIN, G. ; ZANUZO, K. ; MICHELS, M. K. ; CUNHA, N.; SPECHT, S.; SILVA, M. W. Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A St. Hil) sobre o perfil metabólico em ratos alimentados com dietas hiperlipídicas. **Alimentos e Nutrição** (UNESP), v. 18, p. 4, 2007.

MIYAWAKI, O.; LIU, L.; SHIRAI, Y.; SAKASHITA, S.; KAGITANI, K. Tubular ice system for scale-up of progressive freeze-concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 69, p. 107-113, 2005.

MIYAWAKI, O.; INAKUMA, T. Development of Progressive Freeze Concentration and Its Application: a Review. **Food and Bioprocess Technology**. 2020.

MORENO, F. L.; HERNÁNDEZ, E.; RAVENTÓS, M.; ROBLES, C.; RUIZ, Y. A process to concentrate coffe extract by the integration of falling film and block freeze-concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 128, p. 88-95, 2014.

MOSIMANN, A. L. P.; WILHELM FILHO, D.; SILVA, E. L. da. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* (mate) attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Biofactors**, v. 26, p. 59-70, 2006.

MURAKAMI, A. N. N.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNCIO, S. E.; AMANTE, E. R.; ZANOTTA, L. M.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C. C.; TEÓFILO, R.F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 2211- 2216, 2011.

NAKAGAWA, K.; MAEBASHI, S.; MAEDA, K. Freeze-thawing as a path to concentrate aqueous solution. **Separation and Purification Technology**, v. 73, n. 3, p. 403-408, 2010.

OLIVEIRA, C. S. de.; ANDRADE, M. M. P.; COLMAN, T. A. D.; COSTA, F. J. O. G. da.; SCHNITZLER, E. Thermal, structural and rheological behaviour of native and modified waxy corn starch with hydrochloric acid at different temperatures. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, p. 13-18, 2014.

PAGLIOSA, C. M; VIEIRA, M. A.; PODESTÁ, R.; MARASCHIN, M.; ZENI, A. L. B.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, v. 122, p. 173-178, 2010.

PASSARDI, R. L.; SCHVEZOV, C. E.; SCHMALKO, M. E.; GONZÁLEZ, A. D. Drying of *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire by microwave radiation. **Drying Technology**, v. 24, n. 11, p. 1437-1442, 2006.

PIORKOWSKI, D. T.; MCCLEMENTS, D. J. Food Hydrocolloids Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 5-41, 2014.

PRUDÊNCIO, A. P. A.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C.; MURAKAMI, A. N. N.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C. C.; OGLIARI, P. J.; LEITE, R. S. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate

tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 399-405, 2012.

PRZYGODDA, F.; MARTINS, Z. N.; CASTALDELLI, A. P. A.; MINELLA, T. V.; VIEIRA, L. P.; CANTELLI, K.; FRONZA, J.; PADOIN, M. J. Effect of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., *Aquifoliaceae*) on serum cholesterol, triacylglycerides and glucose in Wistar rats fed a diet supplemented with fat and sugar. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 6, p. 956-961, 2010.

REDDY, I.; SEIB, P.A. Modified Waxy Wheat Starch Compared to Modified Waxy Corn Starch. **Journal of Cereal Science**, v. 31, p. 25–39, 2000.

REIS, L. C. B.; SOUZA, C. O.; SILVA, J. B. A.; MARTINS, A. C.; NUNES, I. L.; DRUZIAN, J. I. Active biocomposites of cassava starch: The effect of yerba mate extract and mango pulp as antioxidant additives on the properties and the stability of a packaged product. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 382-391, 2015.

RIBEIRO, M. C.; SANTOS, A.; RIACHI, L. G.; RODRIGUES, A. C. B.; COELHO, G. C.; MARCELLINI, P. S.; BENTO, C. A. de M.; DE MARIA, C. A. B. The effects of roasted yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. ST. Hil.) consumption on glycemia and total serum creatine phosphokinase in patients with traumatic brain injury. **Journal of Functional Foods**, v. 28, p. 240–245, 2017.

RODRIGUES, V. C.; SILVA, M. V.; SANTOS, A. R.; ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I. Evaluation of hot and cold extraction of bioactive compounds in teas. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 2038-2045, 2015.

SABANCI, S.; ICIER, F. Rheological behavior of sour cherry juices concentrated by ohmic and conventional evaporation processes under vacuum. **Journal of Food Processing Preservation**, v. 44, p. 2-9, 2020.

SÁNCHEZ, J.; RUIZ, Y.; RAVENTÓS, M.; AULEDA, J. M.; HERNÁNDEZ, E. Progressive freeze concentration of orange juice in a pilot plant falling film. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 4, p. 644-651, 2010.

SÁNCHEZ, J.; HERNÁNDEZ, E.; AULEDA, J. M.; RAVENTÓS, M. Freeze concentration of whey in a falling-film based pilot plant: Process and characterization. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p. 147-155, 2011.

SANTOS, L. P.; CAON, T.; BATTISTI, M. A.; SILVA, C. H. B.; SIMOES, C. M. O.; REGINATTO, F. H.; DE CAMPOS, A. M. Antioxidant polymeric nanoparticles containing standardized extract of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. for topical use. **Industrial Crops & Products**, v. 108, p 738-747, 2017.

SILVA, E. L. da.; NEIVA, T. J. C.; SHIRAI, M.; TERAOKA, J.; ABDALLA, D. S. P. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 973-979, 2008.

SILVA, S. M. **Mate e Chimarrão**. Agropecuária Catarinense, v. 16, p. 70, 2003.

SINGH, R. P.; SARKAR, A. **Thermal properties of frozen food**. In: Engineering Properties of Foods, Edited by RAO, M. A.; RIZVI, S. S. H.; DATTA, A. K. Chapter 5, pp. 175-207, 2005.

SIQUEIRA, G. L. A.; HORNING, P. S.; SILVEIRA, A. C.; LAZZAROTTO, S. R. S.; CORDOBA, L. P.; SCHNITZLER, E.; LAZZAROTTO, M.. Impact of treatment with HCL/alcoholic in the modification of corn starch. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 129, p. 1705-1713, 2017.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2007.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 219–243, 2004.

SWEEDMAN, M. C.; TIZZOTTI, M. J.; SCHÄFER, C.; GILBERT, R. G. Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 905-920, 2013.

TEIXEIRA, A. S.; NAVARRO, A. S.; MOLINA-GARCÍA, A. D.; MARTINO, M.; DELADINO, L. Corn starch systems as carriers for yerba mate (*Ilex paraguariensis*) antioxidants: Effect of mineral addition. **Food and bioproducts processing**, v. 94, p. 39-49, 2015.

TIAN, B.; LIU, Y.; LIU, J. Smart stimuli-responsive drug delivery systems based on cyclodextrin: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, p. 1-14, 2021.

TOMASI, J. de C. **Bioactive compounds of yerba mate according to genotype, nitrogen fertigation and drying methods and acceptance of mate tea by consumers**. 2020. 142 f. Universidade Federal do Paraná, 2020.

TURNER, S.; COGOI, L.; ISOLABELLA, S.; FILIP, R.; ANESINI, C. Evaluation of the antioxidant activity and polyphenols content of *Ilex paraguariensis* (mate) during industrialization. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 3, p. 23-30, 2011.

VAN DER BURGT, V. E. M.; BERGSMA, J.; BLEEKER, I. P.; MIJLAND, P. J. H. C.; KAMERLING, J. P.; VLIEGENHART, J. F.G. Structural studies on methylated starch granule. **Starch/ Stärke**, v.52, n 2-3, p. 40-43, 2000.

WEBER, F.H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 748-753, 2009.

WEB OF SCIENCE. Relatório de citações 970 resultados de principal coleção do Web of Science entre 1988 e 2020. Tópico "*Ilex paraguariensis*". Disponível em: < http://apps-webofknowledge.ez103.periodicos.capes.gov.br/CitationReport.do?product=WOS&search_mode=CitationReport&SID=5DLaPoCJaH8QtoG2wCL&page=1&cr_pqid=3&viewType=summary >. Acesso em: 7 agosto.2020.

WENDLANDT, W. W. M. **Thermal Analysis**. A Wiley Interscience publication, Ed.: 3, p. 815, 1986.

WENTEN, I. G.; KHOIRUDDIN, K.; REYNARD, R.; LUGITO, G.; JULIAN, H. Advancement of forward osmosis (FO) membrane for fruit juice concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 290, 2021.

WU, Y.; CHEN, Z.; LI, X.; LI, M. Effect of tea polyphenols on the retrogradation of rice starch. **Food Research International**, v. 42, n. 2, p. 221-225, 2009.

XU, L.; WANG, S. The Ginkgo biloba extract concentrated by nanofiltration. **Desalination**, v. 184, p. 305-313, 2005.

YANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Food Hydrocolloids Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactant. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 712-720, 2013.

YU, M.; LIU, B.; ZHONG, F.; WAN, Q.; ZHU, S.; HUANG, D.; LI, Y. Interactions between caffeic acid and corn starch with varying amylose content and their effects on starch digestion. **Food Hydrocolloids**, v. 114, p. 1-9, 2021.

ZHU, F.; CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Effect of Phenolic Compounds on the Pasting and Textural Properties of Wheat Starch. **Starch/Stärke**, v. 60, p. 609-616, 2008.

ZHU, F.; CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Effect of phytochemical extracts on the pasting, thermal, and gelling properties of wheat starch. **Food Chemistry**, v. 112, p. 919-923, 2009.

ZHU, F.; WANG, Y. J. Rheological and thermal properties of rice starch and rutin mixtures. **Food Research International**, n. 49, p. 757-762, 2012.