



# BIOATIVIDADES DE EXTRATOS DE BIO-RESÍDUOS DE ERVA-MATE

## BIOACTIVITIES OF YERBA MATE BIO-RESIDUES EXTRACTS

Luis Gustavo Médice Arabel Costa\*, Fernanda Vitória Leimann<sup>†</sup>,  
Anielle de Oliveira<sup>‡</sup>, Amarilis Santos de Carvalho<sup>§</sup>, Gabrielle Donatto Marcatto<sup>¶</sup>

### RESUMO

Durante o processo de industrialização da erva-mate ocorre a geração de bio-resíduos, que são fonte de compostos bioativos. Neste trabalho objetivou-se obter extratos destes bio-resíduos (EP-extrato palito e EF-extrato folha) e nanoencapsulá-los (NP-nanopartículas palito e NF-nanopartículas folha) e avaliar sua bioatividade. O procedimento foi em única etapa para extração dos compostos e nanoprecipitação. Os extratos e as partículas obtidas foram caracterizados por: TGA, DSC, FTIR, morfologia e tamanho de partículas. As bioatividades avaliadas foram quanto a capacidade antioxidante e atividade do efeito inibitório da enzimática  $\alpha$ -amilase pancreática suína. A análise de FTIR permitiu a identificação de bandas de OH, -CH e C=C características de anéis aromáticos e de compostos fenólicos, identificou-se também a presença de amida nos extratos puro e reticulação entre os extratos puros e a zeína com NaCas quando nanoencapsulados. As análises térmicas indicaram a zeína como uma boa matriz encapsulante, as partículas apresentaram estruturas nanométricas com formatos esféricos e as amostras possuem atividade antioxidante, sendo que apenas NP diferenciou estatisticamente apresentando IC<sub>50</sub> maior, para a  $\alpha$ -amilase somente NF apresentou inibição. Conclui-se então, que o extrato da erva-mate foi encapsulado com sucesso e possui capacidade antioxidante promissora, enquanto para a inibição da enzima alfa-amilase há baixa atividade inibitória.

**Palavras-chave:** *Ilex Paraguariensis*, antioxidantes, biodisponibilidade, nanoencapsulação.

### ABSTRACT

During the yerba mate industrialization process, bio-wastes are generated, which are source of bioactive compounds. In this work it was aimed to obtain extracts of these bio-wastes (EP-stick extract and EF-leaf extract), nanoencapsulate them (NP-stick nanoparticles and NF-leaf nanoparticles) and evaluate their bioactivity. The procedure was a single step for extraction of compounds and nanoprecipitation. The extracts and particles obtained were characterized by: TGA, DSC, FTIR, morphology and particle size. The bioactivities evaluated were regarding to the antioxidant capacity and the inhibitory effect on the porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase enzyme. The FTIR analysis allowed the identification of OH, -CH and C=C bands characteristic of aromatic rings and phenolic compounds, it was also identified the presence of amide in the pure extracts and crosslinking between the pure extracts and zein with NaCas when nanoencapsulated. Thermal analysis indicated zein as a good encapsulating matrix, the particles had nanometric structures with spherical shapes and the samples had antioxidant activity, with only NP statistically different showing a higher IC<sub>50</sub>, for  $\alpha$ -amylase only NF showed inhibition. It can be concluded that the yerba mate extract was successfully encapsulated and has a promising antioxidant capacity, while for the inhibition of the  $\alpha$ -amylase enzyme there is low inhibitory activity.

**Keywords:** *Ilex Paraguariensis*, antioxidants, bioavailability, nanoencapsulation.

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com o IBGE (2019), a erva-mate é uma das principais espécies exploradas no setor de extrativismo vegetal não madeireiro no Brasil. Estudos dos compostos bioativos da *Ilex paraguariensis*,



comprovam efeitos no organismo humano como hipocolesterolêmica, hepatoproteção, estimulante do sistema nervoso central e diurética. Pesquisas comprovam que produtos obtidos a partir da erva-mate podem ser utilizados no controle da obesidade. Além de ter constatado alto teor de compostos antioxidantes presentes nos extratos dessa matéria prima, em especial compostos fenólicos (HECK; DE MEJIA, 2007).

Os bio-resíduos do processamento de erva-mate são gerados durante a etapa de trituração. Os talos com maior granulometria, chamados de palito, não são adicionados ao produto final, são novamente triturados e adicionados ao produto comercial, os produtos de baixa granulometria, denominados bio-resíduo do palito, não adicionados ao produto final e são descartados bem como folhas abaixo da granulometria (VIEIRA *et al.*, 2019).

Sabendo que o efeito funcional dos compostos fenólicos depende não apenas na quantidade ingerida, mas da sua biodisponibilidade (GRGIĆ *et al.*, 2020), uma estratégia empregada para este fim é a encapsulação dos compostos. A técnica abordada foi a nanoprecipitação, que tem sido amplamente descrita na literatura para a formação de nanopartículas (NPS) (LEMES *et al.*, 2015). A estratégia de unificar as etapas de extração à encapsulação já foi proposta por diversos autores como descrito por Santos *et al.* (2020). No presente trabalho, objetivou-se realizar a extração e a encapsulação dos compostos bioativos dos bio-resíduos da erva-mate em um único passo, visando à redução do uso de solventes e do tempo de processo e responder ao seguinte questionamento: a nanoencapsulação oferece proteção adequada ao extrato e ainda confere bioatividade? A técnica de nanoprecipitação foi proposta, por não ter sido ainda estudada por outros autores. O efeito da encapsulação nas propriedades bioativas de capacidade antioxidante (DPPH) e inibição da enzima  $\alpha$ -amilase foram avaliados bem como a interação entre os componentes das nanopartículas através de caracterização por espectroscopia (FTIR), termogravimetria (DSC e TGA) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

## 2 MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos extratos e nanopartículas de compostos bioativos da erva-mate residual

A extração dos compostos bioativos provenientes da matéria prima residual da erva-mate foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Lemes *et al.* (2017) e Santos *et al.* (2018), adaptado. Para a nanoencapsulação, foram pré-homogeneizadas 43,75 g de bio-resíduos da erva-mate (folha-NF ou palito-NP), 15g de zeína (como encapsulante) e o solvente (500 mL) composto por uma mistura de etanol e água (80:20 v/v) e então levados a um sistema de agitação de Ultraturrax (IKA, T25) à 12.000 rpm durante 15 minutos. A mistura obtida foi centrifugada (NT825 Nova Técnica, Brasil), o sobrenadante foi gotejado em uma solução aquosa de caseinato de sódio (0,02% p/v, 500 mL), mantida imersa em um banho de gelo. A mistura foi seca em estufa (Cienlab, Brasil) a 60 °C, até atingir massa constante. Para a extração dos compostos bioativos não encapsulados, seguiu-se a mesma metodologia descrita anteriormente, sem a adição de material encapsulante e surfactante, sendo obtidos os extratos de bio-resíduos de folhas (EF) e de palito (EP) da erva mate.

### 2.3 Caracterização dos extratos e nanopartículas

Para a determinação das características moleculares do extrato e das NPS foi realizada a leitura dos espectros em um espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR AFFINITY-1, Shimadzu) com pastilhas de brometo de potássio. As de TGA e DSC foram realizadas em analisador térmico simultâneo (STA 6000, Perkin Elmer, EUA), as amostras foram aquecidas até 600 °C, com uma taxa de aquecimento de



10 mL.min<sup>-1</sup> e atm de nitrogênio (50 mL.min<sup>-1</sup>). As NPS tiveram sua morfologia avaliada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET, Jeol JEM 2100, 200 kV), tamanho médio em intensidade (Dz, nm) e o índice de polidispersão (PDI, adimensional) determinado por DLS (*Dinamic Ligth Scattering*) em um instrumento Malvern Zetasizer – Nano Series.

#### 2.4 Rendimento das extrações e extração/nanoencapsulação, avaliação da atividade antioxidante e ensaio de inibição da $\alpha$ -amilase pancreática suína

O rendimento da extração e da nanoencapsulação foi determinado gravimetricamente. O cálculo do rendimento foi expresso em porcentagem e determinado através da Equação 1, onde  $V_{TS}$  (mL) é o volume total de solvente utilizado na extração,  $V_a$  (mL) é o volume da alíquota utilizada para o cálculo do rendimento,  $m_{si}$  (g) é a massa de sólidos inicial presente no processo (folhas ou palitos de erva mate no caso da extração; folhas ou palitos de erva mate, zeína e caseinato de sódio no caso da extração/encapsulação).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_{ss} \times V_{TS}}{V_a \times m_{si}} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

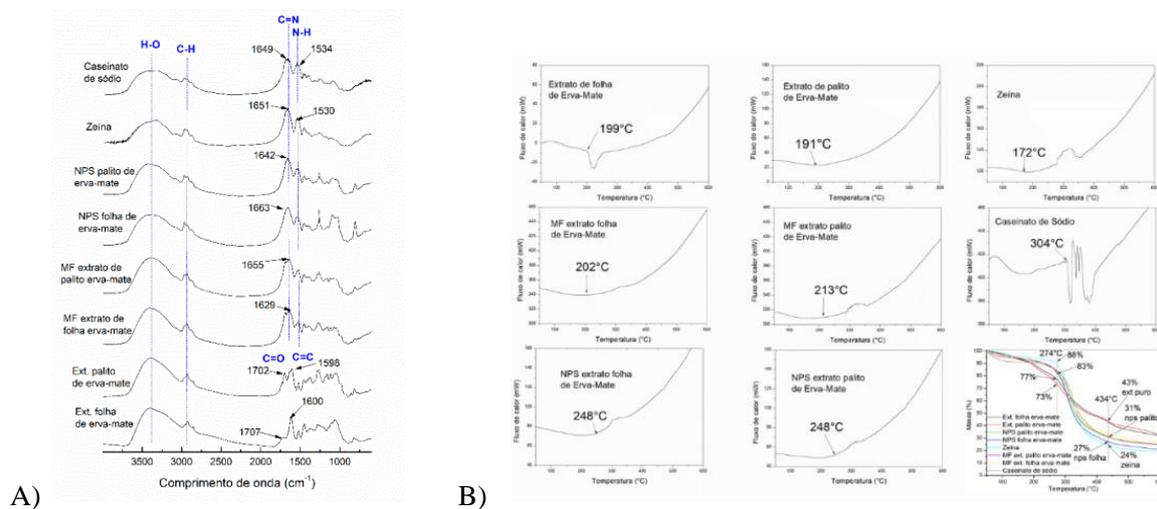
A capacidade antioxidante das NPS e dos extratos foram avaliadas pelo ensaio de DPPH de acordo com BRAND-WILLIAMS, Cuvelier e Berset (1995), adaptado. Foram usados: 10  $\mu$ L de amostra (EF, EP, NF e NP em diferentes concentrações) e 140  $\mu$ L de solução metanólica de DPPH 80  $\mu$ M, além do controle negativo preparado substituindo o volume da amostra por água. A mistura reagiu ao abrigo da luz por 30 min e, realizada a leitura da absorbância a 515 nm (Thermo Plate, TP-Reader). Os resultados foram expressos em termos de IC<sub>50</sub> através do *software* GraphPad Prism 5. Realizou-se o ensaio *in vitro* da  $\alpha$ -amilase pancreática suína de acordo com Oliveira *et al.* (2021). EP, EF, NF e NP foram testados na concentração de 2000  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. A formação do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico foi medida em comprimento de onda de 540 nm, utilizando o espectrofotômetro (Uv-Vis, Ocean Optics, Red Tide USB650 Fiber Optic Spectrometer USA). Os resultados foram submetidos ao teste t-Student (Dz e PDI) ou à análise de variância ANOVA e ao teste de Tukey a um nível de 5% de significância (p<0,05) (DPPH e inibição da  $\alpha$ -amilase) por meio do programa Matlab (R2021a).

### 3 RESULTADOS

A Fig. 1 A é referente aos espectros obtidos por FTIR. Foram identificadas bandas características de acordo com a literatura, todos os espectros apresentaram absorção na faixa de 3000 a 3700 e também próximo a 2900 que são referentes às ligações OH e estiramentos -CH respectivamente, característico de compostos fenólicos. Os EF e EP apresentaram absorção nas regiões de 1700 e 1600 que são característicos de C=O e de C=C, típicos dos fenóis e aromáticos. O caseinato de sódio e a Zeína apresentaram absorção em aproximadamente 1650 e 1540 característicos de C=N e N-H (amidas). As NPS e as MFs apresentaram reticulação nas bandas citadas, especialmente nas que se referem a amida (FENG *et al.*, 2020; HAJJARI *et al.*, 2021; JAHROMI *et al.*, 2020). A Fig. 1 B é referente aos termogramas de DSC e TGA. Os termogramas de DSC mostraram o início da degradação térmica dos extratos na faixa de 190°C, da zeína e do caseinato de sódio em 172 e 304°C respectivamente, tendo este último uma curva acentuada próximo aos 100°C indicando a perda de umidade devido sua higroscopicidade. As MF tiveram a transição térmica iniciada em torno de 200°C aproximadamente, já as NPS começaram a degradação térmica próximo a 250°C, apresentando assim um ganho de 50°C de proteção térmica em relação ao extrato puro. Através da TGA foi possível verificar que em 274°C, a zeína teve apenas 12% de perda de massa, enquanto que os extratos de folha e do palito tiveram 23 e

27% respectivamente. Isso mostra uma maior resistência à degradação da zeína nesta faixa de temperatura, o que justifica sua utilização como material de parede para estes extratos afim de aplicá-los em alimentos, uma vez que temperaturas de processamento não ultrapassam os 300°C. Os valores encontrados neste trabalho são similares aos encontrados por Feng *et al.* (2020), Hajjari *et al.* (2021) e Jahromi *et al.* (2020) e demonstram a capacidade da zeína contribuir para o aumento da termo estabilidade dos compostos voláteis ampliando a faixa de temperatura de processamento até 250°C.

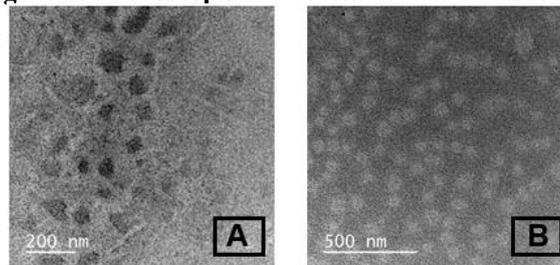
**Figura 1 – A) Espectros de FTIR para os extratos da folha e do palito do bio-resíduo de erva-mate, nanopartículas, componentes puros (NaCas- caseinato de sódio, zeína) e misturas físicas (absorbância); B) DSC e TG Fluxo de Calor endotérmico ↑ Para os extratos da folha e do palito do bio-resíduo de erva-mate, nanopartículas, componentes puros (NaCas- caseinato de sódio, zeína) e misturas físicas**



Fonte: O autor (2021)

Os resultados obtidos para o Dz das nanopartículas foram de  $398,5 \pm 13,5$  nm para NF e a  $365,7 \pm 4,2$  nm para NP, sendo estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Os resultados obtidos indicam uma larga faixa de distribuição de tamanhos com PDI iguais a  $0,43 \pm 0,02$  para NP e  $0,44 \pm 0,01$  para NF ( $p > 0,05$ ). Estes resultados estão de acordo com Lemes *et al.* (2017) que utilizaram uma zeína para a encapsulação da curcumina por nanoprecipitação. Na Fig.2 pode-se observar estruturas nanométricas com formato próximo ao esférico no caso da amostra NF. Os tamanhos das estruturas estão de acordo com os resultados obtidos por DLS.

**Figura 2 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão: (a) NP e (B) NF.**



Fonte: O autor (2021)

Os resultados do rendimento, capacidade antioxidante e inibição da  $\alpha$ -amilase dos extratos e nanopartículas estão apresentados na Tab. 1.



**Tabela 1 - Rendimento das extrações e encapsulações, valores de IC<sub>50</sub> para extratos e nanopartículas dos bio-resíduo da erva-mate frente à inibição do radical DPPH e porcentagem de inibição da enzima  $\alpha$ -amilase a 2.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .**

Amostras	Rendimento (%)*	IC <sub>50</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> )	% de inibição da $\alpha$ -amilase*
EP	19,9	0,174 <sup>a</sup> ± 0,020	0,711
EF	29,8	0,148 <sup>a</sup> ± 0,010	0,709
NP	77,1 (25,8)"	3,244 <sup>b</sup> ± 0,590	0,654
NF	86,9 (34,3)"	1,283 <sup>a</sup> ± 0,040	13,573

Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão; <sup>a,b</sup> letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); \*as análises foram realizadas uma única vez; "resultados entre parênteses indicam o rendimento relativo à massa de extrato presente nas nanopartículas.

**Fonte: O Autor, 2021.**

Os resultados de rendimento da Tab. 1 indicam que o EF apresenta maior teor de sólidos no final do processo, o mesmo se deu para NF. Percebe-se que o processo de encapsulação em conjunto com a extração promoveu um aumento no rendimento do extrato, provavelmente pela interação do encapsulante, zeína, com os compostos fenólicos durante o processo. O mesmo comportamento foi observado por Popović *et al.* (2021) ao realizar a extração e a extração/encapsulação de extrato de *Cornus mas* L. com  $\beta$ -ciclodextrina. De acordo com Malapert *et al.* (2021) este efeito é decorrente de ligações de hidrogênio entre os compostos extraídos e o agente encapsulante, garantindo uma menor saturação do solvente e elevando a concentração dos compostos extraídos. O aumento foi de aproximadamente 15 e 20% para os bio-resíduos de folha e palito, respectivamente. Os resultados obtidos nos ensaios de DPPH deixam evidente uma maior eficácia dos extratos de bio-resíduo não encapsulados, pois apresentaram uma menor concentração necessária para a inibição de 50%, tanto para a folha quanto para o palito quando comparados com NP. Se for considerado o teor de extrato presente nas NPS, que representam 25,8% e 34,3% para NP e NF, respectivamente, os valores de IC<sub>50</sub> relativos à  $\text{mg}_{\text{extrato}}.\text{mL}^{-1}$  (que na tabela estão expressos em  $\text{mg}_{\text{nanopartículas}}.\text{mL}^{-1}$ ) se tornam 0,837 e 0,440, ainda assim maiores que os valores dos extratos puros. Isto pode ser resultado do aprisionamento dos compostos e interação com a matriz encapsulante que permite uma liberação controlada, assim nem todos os compostos presentes nas nanopartículas permanecem de imediato com seus grupamentos funcionais livres para a agirem inibindo o radical DPPH.

Pode ser observado na Tab. 1 que os extratos EF e EP não apresentaram resposta inibitória, bem como as NP. As NF apresentaram um resultado de inibição de 13,57 para a concentração de 2000  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . Oliveira *et al.* (2021) avaliaram o efeito dos extratos da água do cozimento e da casca do pinhão e verificaram que 1871.66 e 460.70  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente, eram necessários para inibição de 50% da enzima  $\alpha$ -amilase pancreática suína.

#### 4 CONCLUSÃO

Foi possível realizar a extração e nanoencapsulação das folhas e palitos da erva mate, obteve-se tamanho de partículas similares ao descritos em trabalhos anteriores Os extratos mostraram através do teste de DPPH que possuem capacidade antioxidante promissora e possivelmente podem atuar no controle da formação de espécies reativas do oxigênio, possivelmente a. Em relação aos testes *in vitro* de  $\alpha$ -amilase, percebeu-se que na concentração testada os extratos não possuem capacidade inibitória das enzimas  $\alpha$ -amilase devido a baixa porcentagem de inibição, porém entre as NPS produzidas, a NF, teve maior resultado de inibição chegando a 13,57%. A nanoencapsulação ofereceu proteção ao extrato, constatou-se atividade antioxidante nas amostras



e houve reticulação entre os componentes das NPS, verificou-se um ganho de 50°C na termoestabilidade dos extratos nanoencapsulados e ainda as NF conferiram discreta inibição de  $\alpha$ -amilase.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Chamada Universal - MCTI / CNPq nº 28/2018, Processo 421541 / 2018-0) e à Fundação Araucária (convênio 039/2019 e edital 15/2019) pelo apoio financeiro e também à Central Analítica Multiusuário da UTFPR Campo Mourão (CAMulti-CM) pelas análises.

## REFERÊNCIAS

- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- DE OLIVEIRA, A. *et al.* Bioactivity screening of pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) seeds extracts: inhibition of cholinesterases and  $\alpha$ -amylases, cytotoxic and anti-inflammatory activities. **Food & Function**, v. Accepted Manuscript, 2021.
- FENG, S.; WANG, D.; GAN, L.; SHAO, P.; JIANG, L.; SUN, P. Preparation and characterization of zein/pectin-based phytosterol nanodispersions and kinetic study of phytosterol release during simulated digestion in vitro. **LWT**, v. 128, p. 109446, 2020.
- GRGIĆ, J. G.; ŠELO, G.; PLANINIĆ PLANINIĆ, M.; TIŠMA, M.; BUCIĆ, A.; KOJIĆ, B.-K. Role of the Encapsulation in Bioavailability of Phenolic Compounds. **Antioxidants**, v. 9, n. 923, p. 1–35, 2020.
- HAJJARI, M. M.; GOLMAKANI, M.-T.; SHARIF, N.; NIAKOUSARI, M. In-vitro and in-silico characterization of zein fiber incorporating cuminaldehyde. **Food and Bioproducts Processing**, v. 128, p. 166–176, 2021.
- HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. **Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations**. 2007.
- JAHROMI, M.; NIAKOUSARI, M.; GOLMAKANI, M. T.; MOHAMMADIFAR, M. A. Physicochemical and structural characterization of sodium caseinate based film-forming solutions and edible films as affected by high methoxyl pectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 1949–1959, 2020.
- LEMES, G. F.; MARCHIORE, N. G.; MOREIRA, T. F. M.; DA SILVA, T. B. V.; SAYER, C.; SHIRAI, M. A.; GONÇALVES, O. H.; GOZZO, A. M.; LEIMANN, F. V. Enzymatically crosslinked gelatin coating added of bioactive nanoparticles and antifungal agent: Effect on the quality of Benitaka grapes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 175–182, 2017.
- LEMES, M.; GOZZO, A. M.; LEIMANN, F. V.; GONÇALVES, O. H.; MARCHIORE, N. G. Rheological and Mechanical Characterization of Gelatin Hydrogels Enzymatically Crosslinked Added of bioactive nanoparticles and antifungal agent: Effect on the quality of Benitaka grapes. **Lwt**, v. 84, p. 175-182, 2017.
- MALAPERT, A.; REBOUL, E.; DANGLES, O.; THIÉRY, A.; SYLLA, nabinty; TOMAO, V.; BAILÓN, E. molecules One-Step Extraction of Olive Phenols from Aqueous Solution Using  $\beta$ -Cyclodextrin in the Solid State, a Simple Eco-Friendly Method Providing Photochemical Stability to the Extracts. 2021.
- POPOVIĆ, B. M.; BLAGOJEVIĆ, B.; LATKOVIĆ, D.; ČETOJEVIĆ-SIMIN, D.; KUCHARSKA, A. Z.; PARISI, F.; LAZZARA, G. A one step enhanced extraction and encapsulation system of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) polyphenols and iridoids with  $\beta$ -cyclodextrin. **LWT**, v. 141, p. 110884, 2021.
- SANTOS, P. D. D. F.; COQUEIRO, A.; BRUM, E. D. S.; OLIVEIRA, S. M.; LEIMANN, F. V.; INEU, R. P.; BONA, E.; GONÇALVES, O. H. Endogenous antioxidant properties of curcuminoids from *Curcuma longa* L. obtained by a single-step extraction/nanoencapsulation approach. **Journal of Food Biochemistry**, [s. l.], 2020.
- SANTOS, C. H. K.; BAQUETA, M. R.; COQUEIRO, A.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R.; GONÇALVES, O. H.; BONA, E.; DA SILVA, M. V.; LEIMANN, F. V. Systematic study on the extraction of antioxidants from pinhão (*araucaria angustifolia* (bertol.) Kuntze) coat. **Food Chemistry**, v. 261, p. 216–223, 2018.
- VIEIRA, M. A.; ROVARIS, A. A.; MARASCHIN, M.; DE SIMAS, K. N.; PAGLIOSA, C. M.; PODEST' A, R.; PODEST' A, P.; AMBONI, R. D. M. C.; BARRETO, P. L. M.; AMANTE, E. R. Chemical Characterization of Candy Made of Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) Residue. 2019