

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DA ALTERAÇÃO DA COR E DEGRADAÇÃO
DA CLOROFILA DURANTE ARMAZENAGEM DE
ERVA-MATE TIPO CHIMARRÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gisela Cabral Malheiros

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**ESTUDO DA ALTERAÇÃO DA COR E DEGRADAÇÃO DA
CLOROFILA DURANTE ARMAZENAGEM DE ERVA-MATE
TIPO CHIMARRÃO**

por

Gisela Cabral Malheiros

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Orientador: Prof^a. Dr^a. Luisa Helena Rycheki Hecktheuer

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DA ALTERAÇÃO DA COR E DEGRADAÇÃO DA
CLOROFILA DURANTE ARMAZENAGEM DE ERVA-MATE TIPO
CHIMARRÃO**

elaborada por
Gisela Cabral Malheiros

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Luisa Helena Rychecki Hecktheuer, Dr^a.
(Presidente/Orientador)

Margareth Linde Athayde, Dr^a. (UFSM)

Tatiana Emanuelli, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 12 de fevereiro de 2007.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Autor e Orientador do projeto da minha vida. Te agradeço por tudo, Senhor, especialmente pela paz nos momentos de dificuldade e pela tua provisão quando eu nada tinha ou podia fazer.

Ao meu marido, Henrique, que teve que suportar a distância todo esse tempo. Obrigada pelo apoio e confiança, e por ter me dado tanta força e amor, perto ou longe, do início ao fim.

À minha família: mãe, sogros, irmãos, cunhadas e cunhados, sobrinhos e sobrinhas e todos os demais. Cada vez mais reconheço a importância de vocês nas minhas conquistas.

À minha orientadora Luisa, que encarou esse desafio comigo. Obrigada pela segurança, objetividade e tranquilidade em todos os momentos, mesmo nos mais conturbados.

À Marta Weber do Canto, quem iniciou este projeto, e confiou a mim uma grande idéia. Obrigada pelo que tem me ensinado desde a graduação.

À Luciana de Abreu, responsável técnica da ervateira Vier, e à ervateira, que me forneceram a erva-mate para a execução das análises. Obrigada, Luciana, por me “socorrer” na hora certa, e por toda colaboração desde então.

Aos professores do DTCA e PPGCTA, que me proporcionaram a base do que eu sei sobre ciência e tecnologia de alimentos, e me ensinaram a amar esta área de conhecimento.

Aos funcionários do DTCA, especialmente a Marialene e o Moisés, que foram companheiros de laboratório e bons parceiros e amigos durante a execução deste trabalho.

Ao professor Auri Brackman, o aluno Anderson Weber e toda equipe do Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita, no qual eu pude realizar a armazenagem das minhas amostras. Obrigada pelo apoio, parceria e amizade.

À Ana Cristina, à Thaylise e à Geisi, companheiras das longas horas de laboratório, que ajudaram com o trabalho e com a amizade.

Aos colegas do PPGCTA, com quem dividi alegrias, angústias, planos, reivindicações, risadas, painéis sensoriais, dúvidas, lágrimas, enfim, pequenas e grandes coisas que foram importantes a seu tempo.

“ó profundidade da riqueza da sabedoria e do conhecimento de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos e inescrutáveis os seus caminhos! Quem conheceu a mente do Senhor? Ou quem foi seu conselheiro? Quem primeiro lhe deu para que ele o recompense? Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas. A ele seja a glória para sempre! Amém.”

Rm 11.33-36
Bíblia Sagrada, Nova Versão
Internacional, 2000

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ESTUDO DA ALTERAÇÃO DA COR E DEGRADAÇÃO DA CLOROFILA DURANTE ARMAZENAGEM DE ERVA-MATE TIPO CHIMARRÃO

AUTOR: Gisela Cabral Malheiros
ORIENTADOR: Profa. Dra. Luisa Helena Rychnecki Hecktheuer
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de fevereiro de 2007

A *Ilex paraguariensis* A. St.-Hill., conhecida popularmente como erva-mate, é uma espécie nativa da região subtropical da América do Sul, a qual é matéria-prima para o produto erva-mate, utilizado principalmente no preparo da bebida chimarrão. Dentre os atributos sensoriais da erva-mate tipo chimarrão, a cor constitui o primeiro critério utilizado pelo consumidor para sua aceitabilidade. A cor verde da erva-mate deve-se à presença de clorofila. Ocorrem perdas expressivas de clorofila no processamento e também na armazenagem da erva-mate, porém o mecanismo e produtos formados ainda não são bem conhecidos. Existem diversos caminhos possíveis para a degradação da clorofila, pois ela é sensível ao pH, enzimas, oxigênio, temperatura e luz, e a velocidade das reações é determinada pela atividade de água do alimento. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações da cor e dos pigmentos clorofílicos e verificar os fatores que as causam durante a armazenagem da erva-mate tipo chimarrão em condições ambientais, nas duas embalagens mais utilizadas comercialmente. Para tal, amostras de erva-mate tipo chimarrão, em embalagem de papel ou laminada, foram armazenadas em uma câmara (25°C; umidade relativa de 75%), as quais foram analisadas em sete momentos (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 semanas de armazenagem). As análises físico-químicas foram as seguintes: determinação de umidade, atividade de água, pH, TBARS e atividade residual da peroxidase; quantificação de pigmentos clorofílicos (clorofila e feofitina); análise instrumental de cor por colorimetria tristímulus (obtendo-se L^* , a^* , b^* , ΔE^* , h° e C^*). Os resultados mostraram variação significativa de todos os itens analisados com o tempo de armazenagem e diferença significativa entre as embalagens, com exceção da peroxidase, que não apresentou atividade residual. A análise de pigmentos clorofílicos mostrou resultados controversos, porém verificou-se sua degradação. Na embalagem de papel, as principais alterações na cor da erva-mate foram redução de h° (do verde inicial para um verde mais amarelado), redução de L^* (escurecimento) e redução de C^* (perda do brilho da cor, de verde brilhante para verde mais opaco). Na embalagem laminada, as principais alterações na cor foram redução de h° (do verde inicial para um verde mais amarelado, porém menos acentuada que na embalagem de papel), aumento de L^* (clareamento), e redução de C^* (perda do brilho da cor, de verde brilhante para verde mais opaco, maior que na embalagem de papel). Concluiu-se que provavelmente a alteração da cor tenha sido influenciada tanto por oxidação quanto por feofitinação dos pigmentos clorofílicos da erva-mate tipo chimarrão, e as reações predominantes de degradação da clorofila tenham sido feofitinação na embalagem de papel e feofitinação e oxidação na embalagem laminada.

Palavras-chave: erva-mate; *Ilex paraguariensis*; chimarrão; clorofila; cor; armazenagem.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduate Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria, RS, Brasil

LEARNING ABOUT COLOR CHANGE AND CHLOROPHYLL DEGRADATION DURING STORAGE OF “ERVA-MATE CHIMARRÃO”

AUTHOR: Gisela Cabral Malheiros
ADVISER: Profa. Dra. Luisa Helena Rychecki Hecktheuer
Santa Maria, February 12th, 2007

Ilex paraguariensis A. St.-Hill., popularly known as erva-mate (Portuguese) or yerba-mate (Spanish), is a native species of the subtropical region of South America, and it is raw material for the product also named erva-mate or yerba mate, consumed mainly under an infusion form called chimarrão (Portuguese) or mate (Spanish). Among the sensorial attributes of erva-mate chimarrão type, color is the first criteria used by consumers to measure its acceptability. The green color of erva-mate is due the presence of chlorophyll. Expressive chlorophyll losses occur during processing and storage of erva-mate, but the mechanisms and products formed are not well known yet. There are many possible pathways for the chlorophyll degradation, because it is sensitive to pH, enzymes, oxygen, temperature and light, and the rate of reactions are determined by the water activity of the food. The aim of this work was to evaluate the color and chlorophyll changes and to verify their causes during storage of erva-mate chimarrão type under ambient conditions, in the most common packaging materials. Samples of erva-mate chimarrão type, conditioned in laminated flexible film or paper, were stored in a chamber (25° C; relative humidity 75%), and analyzed at seven moments (0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 weeks of storage). The physical-chemistry analyses were: moisture, water activity, pH, TBARS and residual activity of peroxidase; quantification of chlorophyllian pigments (chlorophyll and pheophytin); instrumental color analysis by tristimulus colorimetry (obtaining L*, a*, b*, ΔE^* , h° and C*). The results showed that the storage time and the kind of packaging significantly influenced all the items analyzed, except peroxidase, which did not present any residual activity. The analysis of chlorophyllian pigments presented controversial results, but their degradation was verified. Inside the paper package, the main erva-mate color changes were h° reduction (from the initial green to a more yellow green), L* reduction (darkening) and C* reduction (loss of color brightness, from bright-green to a more opaque green). Inside the laminated package, the main color changes were h° reduction (from the initial green to a more yellow green, but less accentuated than the paper package), L* increase (whitening) and C* reduction (loss of color brightness, from bright-green to a more opaque green, more expressive than the paper package). It was concluded that the color change was probably influenced by oxidation as well as by pheophytinization of chlorophyllian pigments in erva-mate chimarrão type, and the predominant chlorophyll degradation reactions were pheophytinization inside the paper package and pheophytinization and oxidation inside the laminated package.

Key words: erva-mate; *Ilex paraguariensis*; chimarrão; chlorophyll; color; storage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Área natural de ocorrência de erva-mate.....	20
FIGURA 2 – Fluxograma do processamento da erva-mate tipo chimarrão.....	24
FIGURA 3 – Diagrama representando o espaço de cores CIELAB.....	31
FIGURA 4 – Diagramas de representação do espaço de cores CIELCH: disposição tridimensional, mostrando as coordenadas L^* , C^* e H° (A) e disposição bidimensional, mostrando as coordenadas C^* e H° (B).....	32
FIGURA 5 – A molécula de clorofila, com o sistema de numeração mais utilizado atualmente.....	35
FIGURA 6 – Estrutura de um cloroplasto: interpretação tridimensional do arranjo das membranas internas de um cloroplasto (A) e micrografia eletrônica de cloroplasto isolado de folha de cevada (B).....	36
FIGURA 7 – Representação esquemática das possibilidades de deterioração de alimentos em relação à atividade de água.....	43
FIGURA 8 – Variação do teor de umidade (A) e da atividade de água (B) em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem.....	52
FIGURA 9 – Variação do pH em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem.....	55
FIGURA 10 – Variação do teor de TBARS em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem.....	56

FIGURA 11 – Variação da concentração de clorofila <i>a</i> (A), clorofila <i>b</i> (B) e clorofila total (C) em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem.....	60
FIGURA 12 – Variação da concentração de feofitina <i>a</i> (A), feofitina <i>b</i> (B) e feofitina total (C) em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem.....	63
FIGURA 13 – Variação do parâmetro L^* em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem.....	65
FIGURA 14 – Variação dos parâmetros de cromaticidade a^* (A) e b^* (B) em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem.....	67
FIGURA 15 – Localização da cor no plano $-a^*$ versus b^* do espaço de cores CIELAB, a luminosidade constante.....	69
FIGURA 16 – Variação da diferença total de cor em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem....	70
FIGURA 17 – Variação do ângulo de matiz em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem.....	72
FIGURA 18 – Variação da cromaticidade em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem.....	73

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1 – Produção extrativista de folhas de erva-mate no Brasil no ano de 2005.....	23
TABELA 2 – Coeficientes de correlação e de determinação entre as coordenadas de cor $L^*a^*b^*$ e o ΔE^* , para os dois tipos de embalagem utilizadas.....	71
TABELA 3 – Coeficientes de correlação entre atividade de água, pH e TBARS e as coordenadas de cor L^* , a^* e b^* e as funções de cor h° , C^* e ΔE^* para os dois tipos de embalagem e os sete períodos de armazenagem.....	75
QUADRO 1 – Aplicações industriais e usos alternativos para a erva-mate.....	22
QUADRO 2 – Porção visível do espectro eletromagnético	29
QUADRO 3 – Nomenclatura e definição dos principais produtos de degradação da clorofila.....	38
QUADRO 4 – Composição da amostra de erva-mate tipo chimarrão utilizada no experimento	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – absorvência

Aa – atividade de água

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANOVA – análise de variância

atm – atmosfera

BHT – butilhidroxitoluol

b.s. – base seca

CIE – *Commission Internationale de l'Eclairage*

CIELAB – *Commission Internationale de l'Eclairage L* a* b* system*

CIELCH – *Commission Internationale de l'Eclairage L* C* h° system*

cm – centímetro

DIC – delineamento inteiramente casualizado

DMF – N,N-dimetilformamida

DTCA – Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos

FCCs – *fluorescent chlorophyll catabolites*

g – grama

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

I. paraguariensis – *Ilex paraguariensis*

IAL – Instituto Adolfo Lutz

kg – quilograma

L – litro

LDL – lipoproteína de baixa densidade

m – metro

M – molar

MDA – malondialdeído

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro

mM – milimolar

NCCs – *nontluorescent chlorophyll catabolites*

nm – nanômetro

nmol – nanomol

NPP – Núcleo de Pesquisa em Pós-Colheita

rpm – rotação por minuto

t – tonelada

TBA – ácido 2-tiobarbitúrico

TBARS – substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico

TCA – ácido tricloroacético

TPO₂ – Taxa de permeabilidade ao oxigênio

TPVA – Taxa de permeabilidade ao vapor d'água

UFMS – Universidade Federal de Santa Maria

U.POD – unidade de atividade da peroxidase

UR – umidade relativa

UV/Vis – ultra-violeta/visível

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise estatística do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre umidade, atividade de água, TBARS e pH. Teste de Tukey, com $p < 0,05$	92
APÊNDICE B - Análise estatística do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre as coordenadas de cor L^* , a^* e b^* do sistema de cor CIELAB. Teste de Tukey, com $p < 0,05$	93
APÊNDICE C - Análise estatística do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre os parâmetros de cor h° , C^* e ΔE^* dos sistemas de cor CIELAB e CIELCH. Teste de Tukey, com $p < 0,05$	94
APÊNDICE D - Análise estatística do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e clorofila total. Teste de Tukey, com $p < 0,05$	95
APÊNDICE E - Análise estatística do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de feofitina <i>a</i> , feofitina <i>b</i> e feofitina total. Teste de Tukey, com $p < 0,05$	96
APÊNDICE F - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a umidade.....	97
APÊNDICE G - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a atividade de água.....	97
APÊNDICE H - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de TBARS.....	98
APÊNDICE I - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre o pH.....	98
APÊNDICE J - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a coordenada L^*	99

APÊNDICE K - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a coordenada a^*	99
APÊNDICE L - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a coordenada b^*	100
APÊNDICE M - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre h°	100
APÊNDICE N - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre C^*	101
APÊNDICE O - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre ΔE^*	101
APÊNDICE P - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de clorofila a	102
APÊNDICE Q - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de clorofila b	102
APÊNDICE R - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de clorofila total	103
APÊNDICE S - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de feofitina a	103
APÊNDICE T - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de feofitina b	104
APÊNDICE U - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de feofitina total	104

SUMÁRIO

RESUMO..... 45

ABSTRACT..... 46

LISTA DE ILUSTRAÇÕES..... 47

LISTA DE TABELAS..... 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... 40

LISTA DE APENDICES 42

SUMÁRIO..... 44

1. INTRODUÇÃO..... 45

2. REVISÃO DE LITERATURA..... 46

2.1. Erva-mate..... 46

2.1.1. Formas de uso..... 47

2.1.2. Situação do setor ervateiro no Brasil..... 47

2.1.3. Processamento da erva-mate..... 47

2.1.3.1. Colheita..... 47

2.1.3.2. Sapeco..... 48

2.1.3.3. Secagem..... 48

2.1.3.4. Cancheamento..... 48

2.1.3.5. Beneficiamento..... 48

2.1.4. Embalagens utilizadas para a erva-mate..... 49

2.2. Cor..... 48

2.2.1. Definição..... 50

2.2.2. Medição instrumental da cor..... 50

2.2.2.1. Sistema CIELAB.....	51
2.2.2.2. Sistema CIELCH.....	52
2.2.3. A cor da erva-mate.....	
2.3. Clorofila.....	
2.3.1. Degradação da clorofila.....	52
2.3.1.1. pH.....	52
2.3.1.2. Enzimas.....	54
2.3.1.2.1. Inativação enzimática.....	55
2.3.1.3. Temperatura.....	58
2.3.1.4. Luz.....	
2.3.1.5. Oxidação.....	
2.3.1.6. Atividade de água.....	59
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.1. Material.....	62
3.1.1. Amostras.....	
3.2. Métodos.....	
3.2.1. Armazenagem.....	65
3.2.1.1. Câmara de armazenagem.....	65
3.2.2. Análises físico-químicas.....	66
3.2.2.1. Preparação das amostras.....	70
3.2.2.2. Umidade.....	71
3.2.2.3. Atividade de água.....	73
3.2.2.4. pH.....	
3.2.2.5. Substâncias reativas ao TBA (TBARS)	
3.2.2.6. Atividade residual da peroxidase.....	74
3.2.2.6.1. Preparação da solução substrato.....	79
3.2.2.6.2. Obtenção do extrato enzimático bruto.....	82
3.2.2.6.3. Ensaio da atividade peroxidásica.....	91
3.2.2.7. Determinação da concentração de pigmentos clorofílicos.....	
3.2.2.7.1. Extração dos pigmentos clorofílicos.....	
3.2.2.7.2. Determinação da concentração de clorofila e feofitina.....	
3.2.2.8. Determinação instrumental de cor.....	
3.2.3. Análise estatística.....	

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. Variação da umidade, atividade de água, pH, enzimas e oxidação durante armazenagem da erva-mate em condições ambientais, nas embalagens papel e laminada	
4.1.1. Umidade e atividade de água.....	
4.1.2. pH.....	
4.1.3. Oxidação (TBARS)	
4.1.4. Atividade residual da peroxidase.....	
4.2. Variação da concentração de pigmentos clorofílicos (clorofila e feofitina) durante armazenagem da erva-mate em condições ambientais, nas embalagens papel e laminada	
4.2.1. Clorofila (<i>a</i> , <i>b</i> e total).....	
4.2.2. Feofitina (<i>a</i> , <i>b</i> e total).....	
4.3. Variação da cor medida instrumentalmente durante armazenagem da erva-mate em condições ambientais, nas embalagens papel e laminada	
4.3.1. Luminosidade (L^*).....	
4.3.2. Parâmetros de cor (a^* e b^*).....	
4.3.3. Diferença total de cor (ΔE^*).....	
4.3.4. Ângulo de matiz (h°).....	
4.3.5. Croma (C^*).....	
4.4. Elucidação de possíveis mecanismos de degradação da clorofila e alteração da cor durante armazenagem da erva-mate em condições ambientais, nas embalagens papel e laminada	
5. CONCLUSÃO	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
APÊNDICES	

1. INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis* A. St.-Hill. (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate, é uma espécie nativa da América do Sul e tem sua área de ocorrência natural restrita a três países: Brasil, Paraguai e Argentina. Cerca de 80% da área de ocorrência pertence ao Brasil, distribuindo-se entre os estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e São Paulo. A região sul é a maior produtora, além de consumidora, devido à tradição do chimarrão (Paraná, 2000).

O chimarrão é a forma mais difundida de consumo da erva-mate, o qual é uma infusão a quente das folhas e ramos processados e é bebido em cuia de porongo (Nietsche, 2000), o recipiente típico desta cultura. Na América do Sul, aproximadamente 30% da população ingere mais de 1 litro/dia desta bebida (Filip, 2000). A cultura de utilização da erva-mate, descoberta pelos índios e posteriormente adotada pelos colonizadores, representa uma expressão cultural forte nas regiões onde é nativa (Pasinato, 2004).

Além da importância cultural, diversos estudos têm comprovado os benefícios à saúde proporcionados pelo consumo de bebida à base de erva-mate. Schinella (2000) investigou as propriedades antioxidantes de um extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e concluiu que a ingestão desses extratos poderia ser um meio efetivo e econômico de suprir quantidades significativas de antioxidantes, aumentando as defesas do organismo humano contra o ataque de radicais livres. Filip (2000) observou que a atividade antioxidante da *I. paraguariensis* era preservada sob a forma de bebida. Gugliucci & Stahl (1995) e Gugliucci (1996) observaram que extratos de *I. paraguariensis* causaram uma diminuição na oxidação da lipoproteína humana de baixa-densidade (LDL), em ambos os sistemas *in vitro* e *in vivo*. Estes e outros efeitos benéficos à saúde humana corroboram para a expansão do consumo de bebidas à base de erva-mate, o que exige maiores investimentos do setor ervateiro.

Para Campos (1996), o desenvolvimento tecnológico da erva-mate e derivados requer investimentos em pesquisa, modernização e otimização dos processos de produção, bem como a busca de uma maior qualidade e diversificação

de produtos, para que dessa forma possa ocorrer a prospecção de novos mercados, nacionais e internacionais.

O controle de qualidade da erva-mate é basicamente empírico e pouco específico, deixando lacunas (Känzig, 1995). Exemplo disso é o índice de qualidade mais importante para os consumidores brasileiros deste produto: a cor verde. A instabilidade da cor verde-brilhante da erva-mate durante a armazenagem é um grande problema, mas ainda é pouco esclarecida.

Na tentativa de ofertar um produto de melhor qualidade, o industrial ervateiro tem utilizado diferentes tipos de embalagem e, gradualmente, tem diminuído a vida-de-prateleira da erva-mate, sendo necessário o recolhimento do produto disponibilizado na gôndola do supermercado. No entanto, este recolhimento gera um grande custo para o setor ervateiro (Santos, 2004), o que requer pesquisas para estudar os mecanismos de alteração da cor nas diferentes embalagens utilizadas, para que se possa controlar ou minimizar os seus efeitos.

A cor verde da erva-mate deve-se à presença de clorofila. A intensidade do verde tem relação direta com a concentração desse pigmento (Morawicki et al, 1999). Estudos têm revelado que ocorrem perdas expressivas de clorofila no processamento (Schmalko & Alzamora, 2001) e também na armazenagem (Santos, 2004) da erva-mate, porém o mecanismo e produtos formados ainda não são conhecidos. Existem diversos caminhos possíveis para a degradação da clorofila, pois ela é sensível ao pH, enzimas, oxigênio, temperatura e luz, e a velocidade das reações é determinada pela atividade de água do alimento (Lajolo et al, 1971; Schwartz & Lorenzo, 1990; Bohn & Walczyk, 2004).

Atividade de água, pH, enzimas e oxidação são os fatores intrínsecos de um alimento que podem provocar alteração da clorofila durante armazenagem, e a embalagem determina se estes fatores podem ser modificados pelo ambiente ou não. Luz e temperatura são fatores extrínsecos, mas se a temperatura for controlada e a luz bloqueada, então é possível avaliar somente o efeito dos fatores intrínsecos sobre a degradação da clorofila, a uma dada temperatura, em um dado alimento.

Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho foi incrementar os conhecimentos sobre a alteração da cor e dos pigmentos clorofílicos durante a armazenagem do produto erva-mate tipo chimarrão, nos dois principais tipos de embalagem utilizados comercialmente. Foram objetivos específicos:

1. Avaliar a influência da embalagem e do tempo na variação de umidade, atividade de água, pH, enzimas e oxidação durante armazenagem de erva-mate em condições ambientais;
2. Avaliar a influência da embalagem e do tempo na variação da concentração de pigmentos clorofílicos (clorofila e feofitina) durante armazenagem de erva-mate em condições ambientais;
3. Avaliar a influência da embalagem e do tempo na variação da cor, medida instrumentalmente, durante armazenagem de erva-mate em condições ambientais;
4. Investigar a existência de correlação entre os agentes de degradação da clorofila e a perda de cor e pigmentos clorofílicos nas embalagens e condições de armazenagem estudadas a fim de elucidar possíveis mecanismos de degradação da clorofila e alteração da cor na erva-mate durante armazenagem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Erva-mate

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.) é uma árvore perene nativa da América do Sul, pertencente à família Aquifoliaceae (Santos, 2004). A altura da erva-mate é variável; quando cultivada varia de 3 – 5 m, porém, na floresta pode alcançar 25 m de altura. As folhas apresentam limbo obovado e comumente têm de 5 cm a 10 cm de comprimento por 3 cm a 4 cm de largura (Carvalho, 1994). A área de ocorrência natural compreende o Noroeste Argentino, Leste do Paraguai e região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Em menor quantidade, aparece também no Mato Grosso do Sul e em reduzidos nichos de ocorrência de *Araucaria angustifolia* em Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Carvalho, 1994; Pasinato, 2004).



Figura 1 – Área natural de ocorrência de erva-mate. Fonte: adaptado de Rotta & Oliveira, 2005.

O nome erva-mate pode ser atribuído tanto à planta, que fornece as folhas e ramos como matéria-prima, quanto ao produto, utilizado para o preparo de bebidas. O produto erva-mate é constituído exclusivamente pelas folhas e ramos de *Ilex paraguariensis*, obtido por processo de secagem e fragmentação destinado ao preparo de "chimarrão" ou "tererê", podendo ser adicionado de açúcar. O produto deve ser designado de "Erva-Mate" ou "Mate", podendo ser seguido da(s) expressão(ões) "chimarrão" e ou "tererê", conforme a finalidade de uso. Se

adicionado de açúcar, deve ser designado de "Erva-Mate com Açúcar" ou "Mate com Açúcar" (Brasil, 2005).

2.1.1. Formas de uso

A cultura de utilização da erva-mate é antiga na região Sul do Brasil, tendo sido descoberta pelos índios e utilizada posteriormente pelos colonizadores, representando uma expressão cultural forte na região (Pasinato, 2004).

O consumo do produto está atrelado à tradição de se tomar chimarrão, chá ou derivados, sendo os estados do Paraná e Rio Grande do Sul os tradicionais consumidores de chimarrão, de forma que cerca de 80% do consumo de erva-mate é sob a forma dessa bebida. Já a região do Mato Grosso do Sul demanda e aprecia mais o chá mate e o tererê (Paraná, 2000).

O chimarrão constitui-se na principal infusão feita à base de erva-mate triturada, com ampla difusão na Argentina, Paraguai, Uruguai e sul do Brasil. Para o consumo tradicional, utiliza-se um recipiente de volume variável, denominado cuia, em que são acomodadas a erva-mate e uma bomba, sendo esta um cilindro metálico que filtra a infusão no seu extremo inferior. "Tomar chimarrão" constitui-se na sucção (pelo outro extremo da bomba) do extrato obtido pela sucessiva adição de água quente (70° a 90° C) à erva-mate Sabbatella et al, 2006).

Diferente do chimarrão, que é uma infusão a quente, o tererê é uma infusão a frio, preparada a partir de um produto diferenciado de folhas de erva-mate, as quais são trituradas de forma mais grosseira (Andrade et al, 1999 apud Pasinato, 2004). As infusões quentes permitem a extração quase completa dos componentes solúveis em água, porém na infusão a frio (tererê) a extração dos componentes solúveis é menor em relação à infusão a quente (Paraná, 2000).

A importância da cultura do chimarrão para o Rio Grande do Sul foi formalizada através da promulgação da Lei nº 11.929, de 20 de Junho de 2003, a qual institui o chimarrão como "bebida símbolo" do Estado do Rio Grande do Sul (Rio Grande do Sul, 2003). Além do mais, por ter sido esteio econômico da Revolução Farroupilha, a erva-mate passou a ser, desde então, representada na bandeira do Rio Grande do Sul (Linhares, 1969 apud Pasinato, 2004).

2.1.2. Situação do setor ervateiro no Brasil

O setor ervateiro ainda depende quase que exclusivamente da comercialização da erva-mate na forma de chimarrão (Rucker et al, 2003), o que limita o mercado às regiões onde é produzida. Estudos têm sido conduzidos com o intuito de identificar rotas alternativas para a aplicação da erva-mate, visando agregar valor a essa importante matéria prima regional (Valduga, 1994 apud Ceni, 2005). Segundo o Anuário Brasileiro da Erva-Mate (1999), há um campo enorme para crescimento do consumo da erva-mate, tanto no Brasil como no exterior.

Além de serem utilizadas para preparo de bebidas, as folhas da erva-mate constituem-se em matéria-prima para corante natural, antioxidantes, cosméticos e medicamentos (Pasinato, 2004), entre outros, conforme o Quadro 1.

<i>Aplicação industrial</i>	<i>Sub-produtos comerciais</i>	<i>Forma de utilização</i>
Bebidas	Chimarrão, tererê, chá mate	Infusão quente ou fria
	Refrigerantes, sucos, cerveja, vinho	Extrato de folhas diluído
Insumos de alimentos	Corante natural, conservante alimentar	Clorofila e óleo essencial
	Sorvete; balas, bombons e caramelos; chicletes e gomas	
Medicamentos	Estimulante do sistema nervoso central	Extrato de cafeína e teobromina
	Compostos para tratamento de hipertensão, bronquite e pneumonia	Extrato de flavonóides
Higiene geral	Bactericida e antioxidante hospitalar e doméstico; esterilizante; emulsificante	Extrato de saponinas e óleo essencial
	Tratamento de esgoto; reciclagem de lixo urbano	
Produtos de uso pessoal	Perfumes, desodorantes, cosméticos, sabonetes	Extrato de folhas seletivo e clorofila

Quadro 1 – Aplicações industriais e usos alternativos para a erva-mate. Fonte: Anuário Brasileiro da Erva-Mate, 1999.

A erva-mate pode ser produzida em dois sistemas distintos, os ervais plantados e os ervais nativos. Além dessa variação, os ervais plantados diferem entre si em função do espaçamento de plantio adotado e/ou da presença de culturas agrícolas intercaladas (Duarte, 2000 apud Mendes, 2005).

A região Sul do Brasil responde pela maior parte da produção nacional, ficando o restante para o Mato Grosso do Sul, conforme a Tabela 1. No Paraná, a maior parte da matéria prima provém de ervais nativos. O Rio Grande do Sul tem a maior parte da produção representada por ervais plantados (IBGE, 2001 apud Lang, 2005; Pasinato, 2004).

Tabela 1 – Produção extrativista de folhas de erva-mate no Brasil no ano de 2005.

Estado	Produção (t)	Participação na produção nacional (%)
Paraná	139.657,0	58,5
Santa Catarina	61.635,0	25,8
Rio Grande do Sul	37.173,0	15,6
Mato Grosso do Sul	404,0	0,2
Total	238.869,0	100,0

Fonte dos dados: IBGE, 2005.

Devido a uma série de fatores – tecnológicos, econômicos e legais – a atividade ervateira nas diversas regiões produtoras tem passado por um momento de transição preocupante. Maiores investimentos em pesquisa, em avaliação de custos dos diferentes sistemas produtivos e em capacitação de mão de obra são algumas das soluções apontadas para as dificuldades vividas atualmente pelo setor ervateiro (Rucker et al, 2003).

Um dos problemas enfrentados pelo setor está relacionado à qualidade sensorial da erva-mate. Com vistas a ofertar um produto padronizado de acordo com o gosto do consumidor de chimarrão, o industrial ervateiro tem utilizado diferentes tipos de embalagem e também tem diminuído a vida útil da erva-mate, sendo necessário o recolhimento do produto disponibilizado na gôndola do supermercado. No entanto, esse recolhimento gera um grande custo para o setor ervateiro, o que exige investimento em pesquisa para buscar um maior conhecimento sobre a vida-de-prateleira da erva-mate (Santos, 2004).

2.1.3. Processamento da erva-mate

Há mais de um século o setor ervateiro não passa por um período de grandes inovações (Rucker et al, 2003). Ainda hoje, são encontradas unidades que empregam tecnologia tradicional, com predomínio de equipamentos manuais. Entretanto, atualmente grande parte da erva-mate comercializada é originária de unidades dotadas de equipamentos mecânicos (Anuário Brasileiro da Erva-Mate, 1999).

O processo agroindustrial do produto agrícola erva-mate no Brasil está estruturado sobre dois ciclos: cancheamento e beneficiamento. O ciclo do cancheamento se constitui por três etapas: sapeco (branqueamento), secagem e cancheamento (trituração), resultando na erva cancheada. O ciclo do beneficiamento se resume em três operações fundamentais: retificação da umidade (por secagem), separação (folhas e palitos) e mistura (formação dos tipos especiais de erva-mate para comercialização) (Paraná, 2000). As principais etapas do processamento da erva-mate tipo chimarrão estão resumidas no fluxograma da Figura 1.

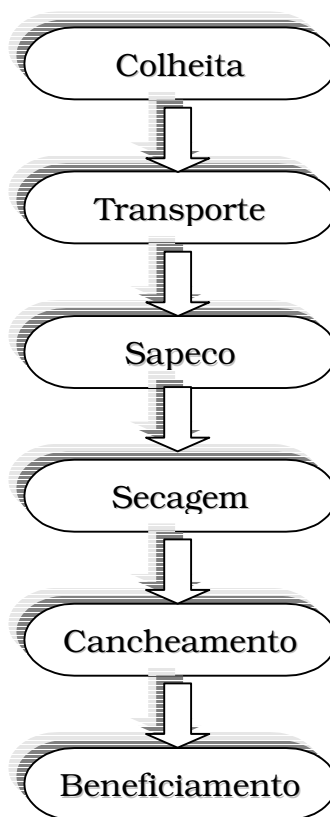


Figura 2 – Fluxograma do processamento da erva-mate tipo chimarrão.

2.1.3.1. Colheita

Na colheita retira-se em torno de 70% de galhos e folhas de cada erva, permanecendo 30% para manter a estrutura e acelerar a recuperação da árvore. O período ideal de colheita da erva-mate (safra) é de maio a setembro, se concentrando nos meses de junho a agosto (de Andrade, 1999 apud Lang, 2005). Porém, visando o abastecimento do mercado durante todo o ano, uma parte dos produtores de erva-mate efetua a colheita durante os meses de verão, período em que a planta está em pleno desenvolvimento. Os impactos da safrinha, como é chamada, sobre a planta, ainda são discutidos (Rucker et al, 2003).

2.1.3.2. Sapeco

O sapeco consiste do contato rápido dos ramos e folhas da erva-mate com chamas de fogo. Na sua forma rudimentar, é realizado manualmente junto ao fogo e consiste na passagem rápida dos ramos com folhas sobre as chamas de uma fogueira de lenha, específica para este fim. O sapeco mecânico é um tratamento térmico realizado em cilindro metálico rotativo, onde a temperatura média da erva na entrada do sapecador é de 400 °C e na saída é de 65°C. O tempo de residência oscila em torno de 8 minutos (Paraná, 2000; Mendes, 2005).

O sapeco da erva-mate tem por finalidade a redução da umidade e a inativação de enzimas, que conferem às folhas verdes alterações da cor, sabor e aroma (Valduga, 1995). Em virtude disso, tal processo deve ser realizado logo após a colheita, a fim de evitar a perda de qualidade dos ramos e folhas da erva-mate, em decorrência da degradação desse produto (Paraná, 2000). Um tratamento térmico ineficiente ou excessivo nessa etapa prejudicaria a qualidade do produto, pois por um lado permitiria uma ação residual das enzimas (principalmente peroxidases), e por outro produziria uma queima no produto (Xander et al, 2000).

2.1.3.3. Secagem

A operação de secagem da erva-mate é feita no carijo ou barbaquá ou ainda em secadores mecânicos. No carijo, processo primitivo, as chamas atuam diretamente sobre a erva, enquanto que no barbaquá, o material recebe o calor através de um canal subterrâneo, na entrada do qual é colocada uma fornalha

(Mendes, 2005). Existem dois tipos de secadores mecânicos: rotativo e de esteira. O tempo de residência e a temperatura média da erva variam entre eles. No secador de esteira, o tempo médio é de 3 horas e a temperatura varia entre 90 e 110°C. No secador rotativo, o produto permanece em contato direto por aproximadamente 30 minutos. No entanto, na entrada do secador a temperatura média é de 350°C e na saída 110°C (Esmelindro et al, 2002).

O material entra no secador com uma umidade média de 25% e sai com aproximadamente 5% de umidade (Valduga et al, 2003). A função da secagem na erva-mate está em reduzir a umidade. O excesso de água pode ocasionar deterioração microbiológica e a degradação enzimática dos constituintes nutricionais e químicos do produto (Paraná, 2000), além de acelerar outros processos de deterioração.

2.1.3.4. Cancheamento

O cancheamento consiste na trituração da erva após o processo de secagem. Este pode ser feito por meio de um triturador de madeira dura (ao nível do produtor), ou um cancheador metálico (ao nível da indústria). Em seguida, a erva é peneirada e o material coletado passa a denominar-se erva cancheada. Esse termo é utilizado devido à produção da erva-mate cancheada ser realizada em local assoalhado denominado de cancha, onde a massa foliar é submetida à trituração ou fragmentação (Costa, 1989). Esta pode ser usada diretamente como matéria-prima para a produção de chás ou como matéria-prima para engenhos de beneficiamento, especialmente para a preparação de produtos comerciais, como a erva-mate para chimarrão (Esmelindro, 2002; Mendes, 2005).

2.1.3.5. Beneficiamento

A erva cancheada é peneirada e misturada em proporções de folhas e palitos de acordo com o produto desejado. A erva-mate cancheada é armazenada em sacos, tulas ou a granel, quando destinada ao mercado interno, tendo como tempo de armazenagem de três a quinze dias. Se destinada à produção de erva-mate para chimarrão, após a mistura, a erva-mate é moída para reduzir a granulometria do

material, utilizando moinho de facas ou soque (Valduga et al, 2003 apud Santos, 2004).

2.1.4. Embalagens utilizadas para a erva-mate

Alimentos desidratados alteram-se durante a armazenagem devido principalmente a perdas de vitaminas e pigmentos, reações de escurecimento, degradações oxidativas, alterações de sabor e aroma e modificações na textura. A embalagem tem o poder de estender a vida-de-prateleira desses alimentos, devido a sua capacidade de proteção de fatores ambientais como luz, vapor de água, gases e odores. Dessa forma também mantém o alimento microbiologicamente saudável e preserva suas características sensoriais, além de proporcionar fácil manuseio e fornecer informações ao consumidor (Jayaraman & Das Gupta, 1995; Man & Jones, 1999).

A embalagem para erva-mate tipo chimarrão tradicionalmente mais utilizada é a que associa papel kraft e monolúcido. Ela é constituída de duas camadas, sendo a externa para impressão gráfica e a interna como barreira à gordura, apresentando alta permeabilidade a gases e ao vapor d'água. De acordo com relatos das indústrias processadoras de erva-mate, sua vida útil nesta embalagem não é maior que 45 dias. Dessa forma, as indústrias são obrigadas a retirar o produto das gôndolas dos supermercados, por não apresentar a qualidade requerida pelo consumidor. Como alternativa, o industrial ervateiro tem utilizado diferentes tipos de embalagem, como os filmes flexíveis laminados metalizados (Santos, 2004), que são plásticos cada vez mais utilizados na embalagem de alimentos.

As principais vantagens dos plásticos são sua grande diversidade e gama de propriedades, leveza, relativo baixo custo e versatilidade. As principais desvantagens são não proporcionar uma barreira absoluta para gases e vapores e a possibilidade de interagir com o alimento embalado (Man & Jones, 1999).

Um único polímero é freqüentemente incapaz de oferecer todas as propriedades necessárias para criar características de barreira adequadas. Isso gerou a necessidade de estruturas multicamadas e técnicas como a laminação, a qual consiste na associação de plástico com alumínio ou papel, originando os laminados. Os filmes flexíveis laminados metalizados são constituídos de polímeros específicos com adicional processo de metalização. A metalização é um processo

que permite a aplicação sobre um filme flexível de uma camada muito fina (10-100nm) e uniforme de um metal, normalmente o alumínio. Isso aumenta expressivamente as propriedades de barreira à luz e ao oxigênio, estendendo a vida-de-prateleira do produto (Man & Jones, 1999; Santos, 2004). Os filmes flexíveis mais freqüentemente utilizados para erva-mate são associações de polietileno de baixa densidade com polipropileno, submetidos à metalização com alumínio.

2.2. Cor

Aparência é um dos principais atributos de qualidade, pois é a primeira impressão que um consumidor tem de um dado alimento. É um termo abrangente que envolve tamanho, forma, textura, massa, briho, cor e outros. Cor, como um aspecto da aparência, tem de estar dentro de uma faixa esperada para aceitação do alimento. Se a cor é inaceitável, outros aspectos sensoriais, como sabor e textura, provavelmente nem chegarão a ser julgados (Francis, 1995).

Estudos científicos têm mostrado que a cor do produto afeta a percepção de outros atributos, como aroma, gosto e sabor. Em estudos com bebidas de frutas, a cor afetou significativamente a percepção de intensidade de sabor, geralmente aumentando com o aumento da cor, mesmo para amostras sem sabor (Clydesdale, 1993; Lawless & Heymann, 1999).

Além de influenciar outras características sensoriais, e dessa forma, aceitabilidade, escolha e preferência, a cor há muito tempo tem sido utilizada como um indicador dos processos dinâmicos ocorrendo em um produto (Francis, 1995). A segurança de um alimento também é avaliada pelos consumidores através desse parâmetro (Clydesdale, 1993).

2.2.1. Definição

Fisicamente, cor é a percepção que resulta da detecção da luz depois que esta interagiu com um objeto. A cor percebida de um objeto é afetada por três fatores: a composição química e física do objeto, a composição espectral da fonte de luz que ilumina o objeto e a sensibilidade dos olhos do observador. Uma mudança em qualquer desses fatores pode alterar a cor percebida (Lawless & Heymann, 1999).

Os comprimentos de onda na porção visível do espectro eletromagnético (ver Quadro 2) não absorvidos pelo objeto são refletidos e estes são captados pelo olho humano. Após o impacto dos comprimentos de onda específicos nas células da retina, estas enviam um sinal via nervo óptico para o cérebro, o qual interpreta a resposta em termos do que nós chamamos de cor (Francis, 1995; Lawless & Heymann, 1999).

Cor	Faixa de comprimento de onda (nm)
Violeta	380-400
Azul	400-475
Verde	500-570
Amarelo	570-590
Laranja	590-700
Vermelho	700-770

Quadro 2 – Porção visível do espectro eletromagnético. Fonte: Lawless & Heymann, 1999.

As células da retina responsáveis pela captação da luz são os cones e os bastonetes. Esses são sensíveis ao branco e ao preto, mesmo a baixíssimas intensidades de luz. Os cones, por sua vez, são as células que decodificam a cor de um objeto, operando a altas intensidades de luz. Existem três tipos de cones – vermelho, verde e azul –, que diferem entre si na sensibilidade aos comprimentos de onda da luz visível, o que ocorre devido à presença de pigmentos nessas células (Francis, 1995; Lawless & Heymann, 1999).

2.2.2. Medição instrumental da cor

Técnicas de medição instrumental de cor costumam ser rápidas e simples e são usadas na pesquisa na área de alimentos com o propósito de obter valores objetivos de cor (Berset & Caniaux, 1983). Diversos estudos já demonstraram altas correlações estatísticas entre os parâmetros de cor obtidos pelos métodos instrumentais e a concentração de pigmentos e a análise sensorial (Berset & Caniaux, 1983; Steet & Tong, 1996; Sinnecker et al, 2002; Schmalko et al, 2005).

Um dos métodos disponíveis mais importantes é o sistema de colorimetria tristimulus na qual sinais de uma amostra por reflexão ou transmissão são convertidos em unidades relacionadas à maneira como o olho humano vê a cor. Um colorímetro tristimulus contém geralmente três combinações de filtro-fotocélula as quais imitam as respostas dos cones vermelhos, verdes e azuis do olho (Francis, 1995).

Os valores obtidos pelo equipamento são convertidos em relações matemáticas para descrever a cor, chamados sistemas de cor. Diversos sistemas de cor foram desenvolvidos e regulamentados pela CIE (Commission Internationale de l'Eclairage, ou seja, Comissão Internacional de Iluminação). Independente do sistema adotado, os dados são projetados em um sólido de cor tridimensional, denominado espaço de cores. "Medir a cor" significa "localizar a cor", em termos de coordenadas, dentro de um espaço de cores (Francis, 1995; Lawless & Heymann, 1999).

2.2.2.1. Sistema CIELAB

Em 1976, com a intenção de estabelecer um padrão, a CIE recomendou a utilização da escala de cor CIE $L^*a^*b^*$ (ou CIELAB). O sistema de cor CIELAB mais proximamente representa a sensibilidade humana para cor, pois é a escala de cor mais uniforme e linear. Em uma escala de cor uniforme, distâncias iguais entre dois pontos no gráfico correspondem a diferenças igualmente percebidas pelo olho humano (Minolta, 1991; Hunterlab, 1996).

O espaço de cores CIELAB é organizado em coordenadas retangulares cartesianas, conforme a Figura 3. O eixo L^* vai do topo à base, sendo que o valor máximo de L^* é 100 (branco) e o mínimo é zero, o qual representa o preto. Os eixos a^* e b^* não tem limites numéricos específicos, de forma que o vermelho é representado por $+a$ e o verde por $-a$; o amarelo como $+b$ e o azul $-b$ (Hunterlab, 1996; Lawless & Heymann, 1999).

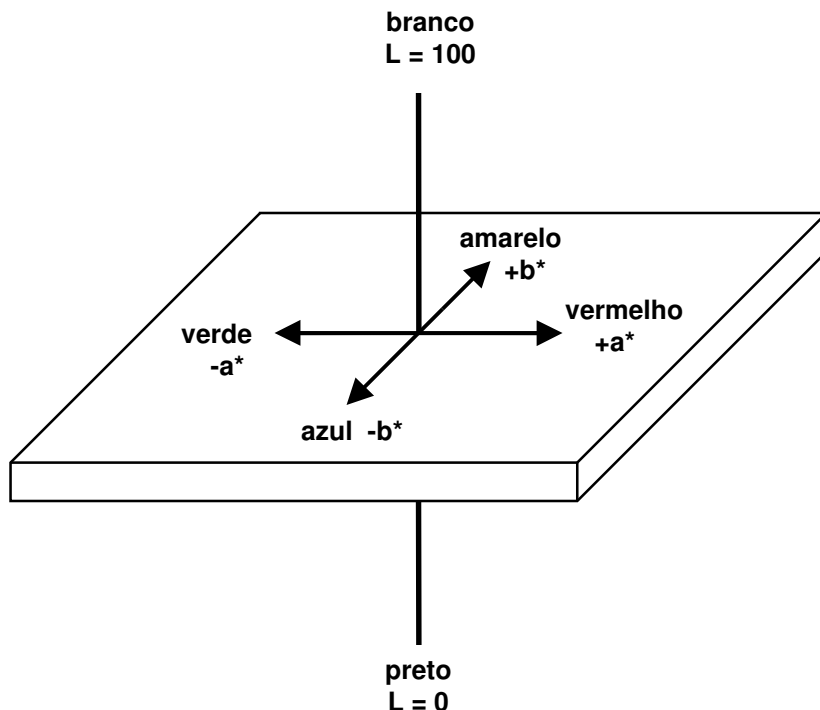


Figura 3 – Diagrama representando o espaço de cores CIELAB. Fonte: adaptado de Hunterlab, 1996.

A diferença total de cor (ΔE^*) é um parâmetro que pode ser calculado a partir de $L^*a^*b^*$. O ΔE^* concentra as diferenças entre L^* , a^* e b^* de duas amostras em um único valor numérico. Esta variável, a qual é calculada pela fórmula 1, foi desenvolvida para se aproximar de uma diferença perceptível ao olho humano (Lawless & Heymann, 1999).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

2.2.2.2. Sistema CIELCH

Apesar de CIELAB ser o sistema padrão, outros sistemas podem ser adotados para facilitar a comparação ou a compreensão de cores. O sistema de cor $L^*C^*h^\circ$ (L^* = lightness; C^* = chroma; h° = hue angle) utiliza coordenadas cilíndricas em vez de coordenadas cartesianas. Conforme a Figura 4, L^* é a luminosidade, C^* é o croma (ou índice de saturação) e h° é o ângulo de matiz (Minolta, 1991).

Neste espaço de cores, uma cor específica é descrita como um ponto no espaço tridimensional matiz-luminosidade-croma, o que é compreendido de forma mais intuitiva pelo cérebro humano. O ângulo de matiz é o que tipicamente o

consumidor refere-se como a cor do objeto (verde, por exemplo). A luminosidade é também chamada de brilho do objeto (verde escuro ou claro). Croma é a quantidade pela qual um dado matiz desvia do cinza neutro (verde puro ou verde acinzentado). O croma de um ângulo é imaginado como uma linha de matiz constante que parte do centro da esfera em direção à borda (Lawless & Heymann, 1999).

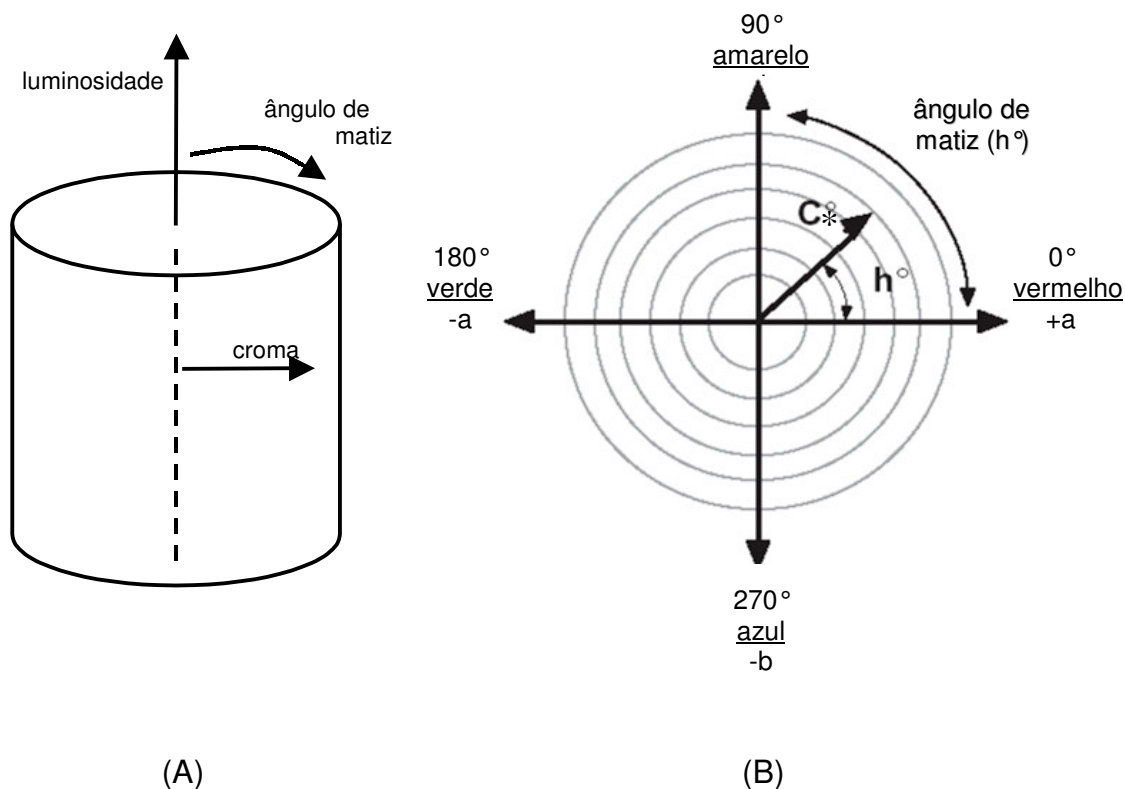


Figura 4 – Diagramas de representação do espaço de cores CIELCH: disposição tridimensional, mostrando as coordenadas L^* , C^* e h° (A) e disposição bidimensional, mostrando as coordenadas C^* e h° (B). Fontes: (A) adaptado de Hunterlab, 2001 e (B) adaptado de Zielnik, 2006.

A luminosidade da cor de um objeto indica a relação entre luz refletida e absorvida, sem levar em consideração o comprimento de onda específico envolvido. O ângulo de matiz é a percepção da cor, a qual resulta da absorção e reflexão dos comprimentos de onda da energia radiante pelo objeto. O croma (saturação ou brilho) da cor indica quanto uma dada cor difere do cinza (Lawless & Heymann, 1999).

Os parâmetros de cor do sistema CIELCH são obtidas matematicamente a partir das coordenadas do sistema CIELAB, por meio das fórmulas 2 a 6:

$$L^* = L^* \quad (2)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (3)$$

$$h^\circ = \tan^{-1} (b^*/a^*), \text{ quando } a^* > 0 \text{ e } b^* \geq 0 \quad (4)$$

$$h^\circ = 180^\circ + \tan^{-1} (b^*/a^*), \text{ quando } a^* < 0 \quad (5)$$

$$h^\circ = 360^\circ + \tan^{-1} (b^*/a^*), \text{ quando } a^* > 0 \text{ e } b^* < 0 \quad (6)$$

2.2.3. A cor da erva-mate

Dentre os atributos sensoriais da erva-mate, a cor constitui o primeiro critério utilizado pelo consumidor para aceitabilidade da qualidade do produto (Rucker, 2000). Os países Brasil e Argentina, como maiores consumidores de erva-mate, apresentam diferentes preferências quanto à cor. Os argentinos consomem geralmente um produto com cor verde-oliva a amarelo-dourado, enquanto os brasileiros preferem um tom verde-brilhante (Morawicki et al, 1999; Galeano et al, 2006).

A cor verde da erva-mate está relacionada à concentração de clorofila. No entanto, cada etapa do processamento é responsável pela redução deste componente. No decorrer do processamento, é o sapeco que provoca maior variação na concentração de clorofila. Porém, na armazenagem, a erva-mate perde considerável porcentagem do pigmento (Morawicki et al, 1999).

Para Valduga et al (2005), o fator tempo influenciou significativamente na degradação da cor, determinada por método instrumental. A análise sensorial de cor concordou com a análise físico-química, revelando que o tempo de armazenagem interferiu significativamente neste aspecto. Outros estudos em erva-mate verificaram perda de cor e degradação da clorofila durante armazenagem, observando influência da temperatura e da atividade de água sobre a velocidade de reação (Morawicki et al, 1999; Schmalko et al, 2005).

Segundo Santos (2004), a erva-mate tipo chimarrão, disponível no mercado, apresenta maior porcentagem granulométrica de pó moderadamente fino (classificação segundo a ABNT, a Associação Brasileira de Normas Técnicas), o que é requerido pelo seu uso tradicional. A reduzida granulometria da erva-mate resulta numa grande área de superfície do material, a qual propicia problemas de

estabilidade devido à absorção de umidade e ao favorecimento de reações oxidativas. Estes processos podem estar intimamente ligados com a perda de cor durante a armazenagem de erva-mate, o que já foi sugerido para outros vegetais (Lajolo & Lanfer-Marquez, 1982; King et al, 2001).

O escurecimento não-enzimático (reação de Maillard) também pode afetar a cor da erva-mate, tendo em vista que é um problema freqüente na armazenagem de vegetais desidratados. Esse fenômeno caracteriza-se por reações muito complexas que levam à formação de pigmentos escuros e modificações de odor e sabor nos alimentos. O desenvolvimento dessas reações é influenciado pelos tipos de açúcares e aminas presentes, pH, temperatura e atividade de água (Cheftel & Cheftel, 1992; Jayaraman & Das Gupta, 1995).

2.3. Clorofila

Os pigmentos verdes dos organismos fotossintéticos são conhecidos coletivamente como clorofilas, ou simplesmente “clorofila”, os quais encontram-se nas células vegetais fotossintetizantes em organelas chamadas cloroplastos (Schwartz & Lorenzo, 1990). A clorofila é o pigmento mais largamente distribuído na natureza (Nollet, 1996). É também o principal pigmento absorvedor de luz da fotossíntese, a qual consiste num processo metabólico fundamental a todos os organismos vivos (Lehninger, 1976).

Os cloroplastos das plantas superiores sempre contêm dois tipos de clorofila: clorofila *a* e clorofila *b*. Comumente, a razão molar entre clorofila *a* e *b* em plantas superiores é de aproximadamente 3:1. Embora ambas sejam verdes, os seus espectros de absorção são ligeiramente diferentes, de maneira que para o olho humano a clorofila *a* apresenta uma tonalidade verde-azulada, e a clorofila *b*, verde-amarelada (Schwartz & Lorenzo, 1990; Lehninger et al, 1995; Steet & Tong, 1996).

Quimicamente, a molécula de clorofila é uma porfirina. Porfirina é qualquer pigmento tetrapirrólico macrocíclico, na qual os anéis de pirrol formam um circuito conjugado fechado. Na clorofila, os átomos de nitrogênio dos grupos pirrol estão coordenados com um átomo de magnésio central (Figura 5). A molécula ainda contém um anel isocíclico, que compartilha dos carbonos 13, 14 e 15 do anel tetrapirrólico, além de um resíduo ácido propiônico na posição 17. O último dos três carbonos do ácido é geralmente esterificado com uma porção fitol, uma longa e

hidrofóbica cadeia álcool, com 20 carbonos. A clorofila *b* difere da clorofila *a* pela presença de um resíduo aldeído ao invés de um grupo metila na posição 7. Clorofila *c* e protoclorofila são formas que diferem das anteriores, porém estão presentes somente em algas (Nollet, 1996; Fennema, 2000; Schoefs, 2002).

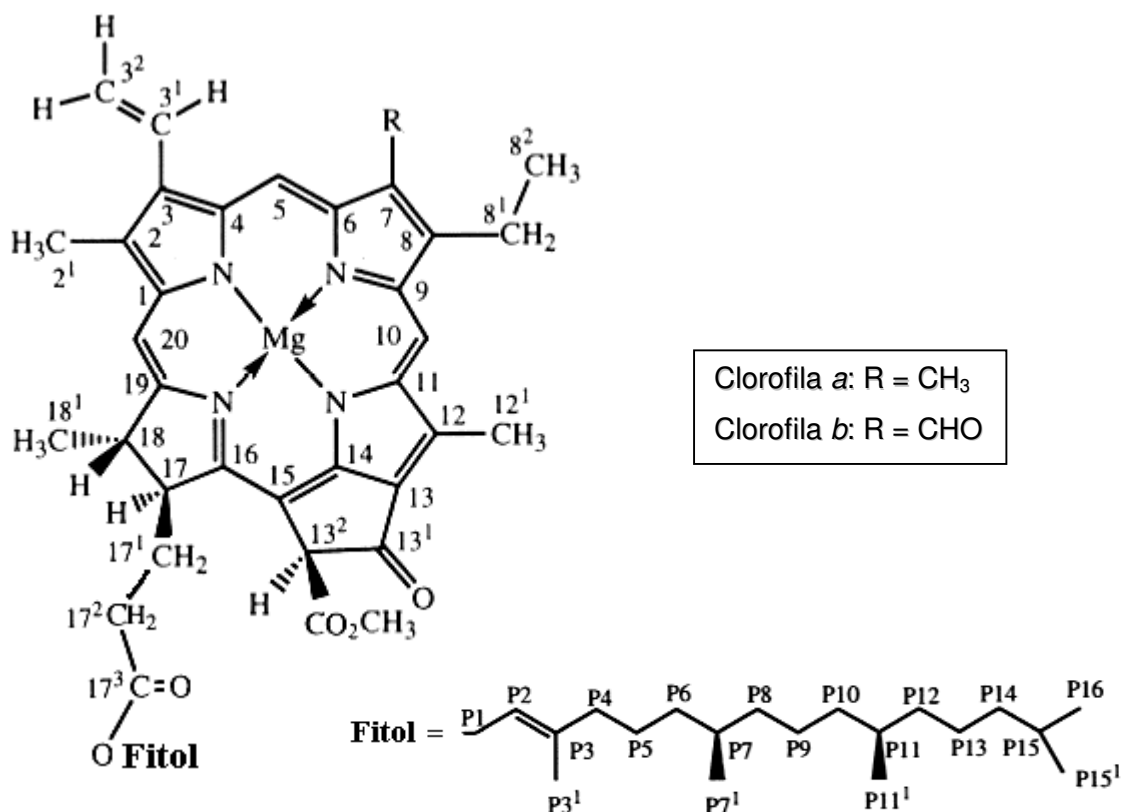


Figura 5 – A molécula de clorofila, com o sistema de numeração mais utilizado atualmente. Fonte: adaptado de Hyvarinen & Hynninen, 1999.

O fato de os pigmentos clorofílicos apresentarem um circuito fechado de ligações duplas conjugadas lhes permite a absorção de luz. Os espectros de absorção da clorofila *a* e da clorofila *b* em solventes orgânicos revelam a presença de duas bandas distintas, uma no vermelho e outra no azul, com pequenas diferenças entre elas. Modificações químicas que não afetam o cromóforo não alteram o espectro de absorção desses pigmentos (Shoefs, 2002).

Os cloroplastos são organelas das células vegetais nos quais está localizado o aparelho fotossintético (Lehninger, 1976). Eles contêm um sistema de membranas chamadas tilacóides, e estas são freqüentemente conectadas, formando pilhas de membrana chamadas grana (singular = granum), as quais estão embebidas no estroma (Salisbury & Ross, 1991) (Figura 6).

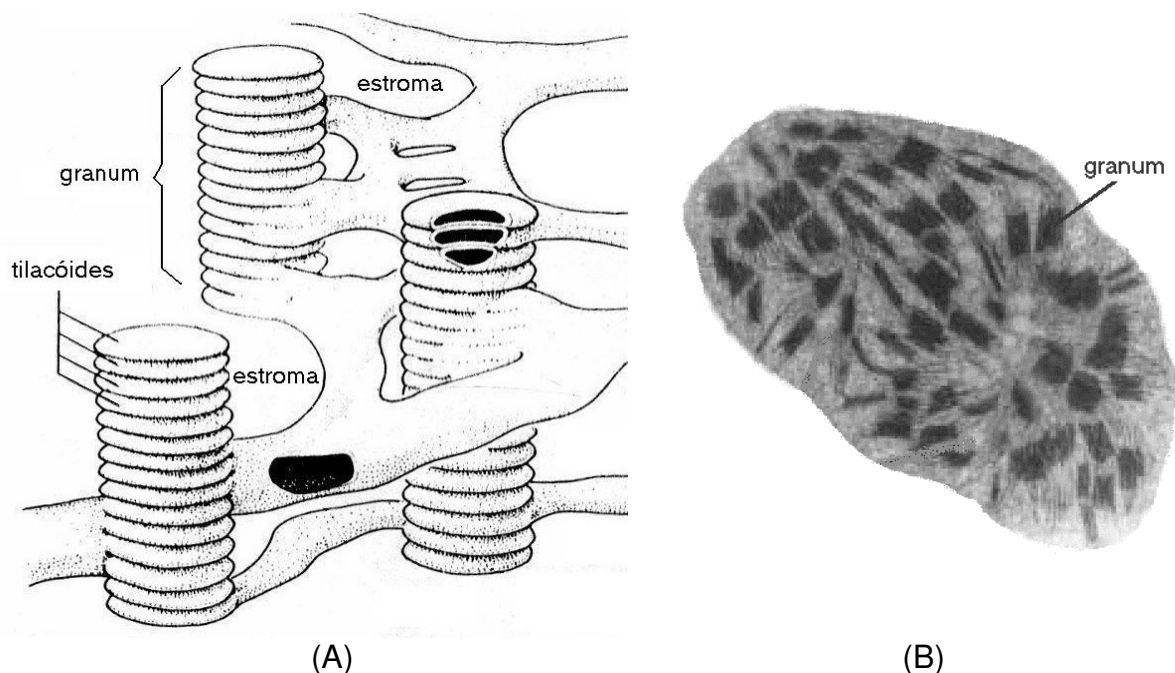


Figura 6 – Estrutura de um cloroplasto: interpretação tridimensional do arranjo das membranas internas de um cloroplasto (A) e micrografia eletrônica de cloroplasto isolado de folha de cevada (B). Fontes: (A) adaptado de Spundova et al, 2003 e (B) adaptado de Salisbury & Ross, 1991.

A membrana tilacóide dos cloroplastos é uma bicamada de lipídios composta principalmente de galactolipídios e minoritariamente de fosfolipídios. Os ácidos graxos dos lipídios tilacóides são basicamente constituídos dos ácidos linolênico e linoléico, os quais dão à membrana tilacóide fluidez peculiar, e assim os compostos dentro dela são relativamente móveis. A clorofila encontra-se encaixada dentro da membrana e fixada por ligações não covalentes a proteínas (Heaton & Marangoni, 1996). Nos complexos pigmento-proteína também estão presentes carotenóides, que têm importância vital na proteção do aparato fotossintético. Eles estão intimamente associados com a clorofila, de forma a dissipar a energia excessiva nessas moléculas (Matile, 2000). A longa cadeia lateral da clorofila (fitol) facilita a associação com carotenóides e lipídios da membrana (Coulter, 1998).

2.3.1. Degradação da clorofila

A perda de clorofila causa mudança de cor nos vegetais, o que muitas vezes está associado com a perda de qualidade destes quando utilizados como alimentos. Pela degradação da clorofila, a cor passa de verde-brilhante para verde-oliva em

alimentos processados e uma ampla variedade de cores em tecidos senescentes, no caso de vegetais consumidos *in natura* (Heaton & Marangoni, 1996).

Em plantas senescentes, a célula regula internamente o catabolismo da clorofila. Diferentemente, em alimentos processados os fatores ambientais e a bioquímica celular atuam concomitantemente determinando as rotas de degradação do pigmento (Heaton & Marangoni, 1996).

A clorofila é sensível ao pH, enzimas, temperatura, luz e oxigênio, os quais tem maior ou menor influência na sua degradação de acordo com a atividade de água do meio (Lajolo et al, 1971; Schwartz & Lorenzo, 1990; Bohn & Walczyk, 2004). Em virtude disso, a constituição do alimento e as condições de processamento, bem como o ambiente de armazenagem, influenciam grandemente no curso da degradação da clorofila em alimentos processados (Heaton & Marangoni, 1996; Morawicki et al, 1999).

A seguir, os agentes e os respectivos mecanismos de degradação da clorofila serão elucidados separadamente. O Quadro 3 apresenta os principais derivados da clorofila.

2.3.1.1. pH

Os íons hidrogênio têm a capacidade de remover facilmente o átomo de magnésio central e substituí-lo por hidrogênio, transformando irreversivelmente clorofila em feofitina (López-Ayerra et al, 1998). Ácidos presentes no material fresco ou formados durante o processamento térmico são os principais responsáveis pela reação de feofitinação (Maharaj & Sankat, 1996).

A feofitinação causa uma dramática mudança de cor, de um verde-brilhante para um verde-oliva, e pode ocorrer sob muitas condições de processamento e armazenagem (Lajolo et al, 1971; Schwartz & Lorenzo, 1990). Em tecidos bioquimicamente ativos, pode ser formada através da enzima Mg-dequelatase (Roca et al, 2004).

A velocidade da reação de feofitinação é geralmente maior que a de outras rotas de degradação da clorofila, sendo considerada o mais importante mecanismo de destruição da clorofila durante o processamento e armazenagem de vegetais (Martins & Silva, 2002). A formação de feofitina a geralmente é mais rápida que a de

feofitina *b*, devido à diferente sensibilidade das respectivas clorofilas aos íons hidrogênio (Fennema, 2000).

Pigmento	Conceito
Feofitinas	Derivados da clorofila sem magnésio
Clorofilidas	Produtos que contêm um ácido propiônico na posição C-17, resultante da hidrólise enzimática ou química da cadeia fitol
Feoforbídeos	Produtos que contêm um ácido propiônico na posição C-17, resultante da hidrólise enzimática ou química da cadeia fitol e que são carentes de magnésio
Compostos “piro”	Derivados nos quais o grupo carbometoxila foi substituído por hidrogênio
Epímeros <i>a'</i> e <i>b'</i>	Isômeros de clorofila nos quais ocorreu epimerização do carbono C-13 ²
Alômeros	Produtos da oxidação do carbono C-13 ² , os quais apresentam um átomo de oxigênio ligado a este
Clorinas	Derivados do feoforbídeo <i>a</i> resultantes da clivagem do anel isocíclico
Rodinas	Os derivados correspondentes do feoforbídeo <i>b</i>
FCCs	<i>Fluorescent chlorophyll catabolites</i> , ou seja, catabólitos fluorescentes da clorofila; resultantes da clivagem oxidativa da porfirina entre dois anéis pirrólicos, não são coloridos
NCCs	<i>Nontluorescent chlorophyll catabolites</i> , ou seja, catabólitos não-fluorescentes da clorofila; resultantes da degradação dos FCCs, não são coloridos e não possuem fluorescência

Quadro 3 – Nomenclatura e definição dos principais produtos de degradação da clorofila. Fonte: adaptado de Fennema, 2000.

A hidrólise do grupo fitol das feofitinas leva à formação dos feoforbídeos, o que usualmente ocorre por via enzimática (Schwartz & Lorenzo, 1990).

2.3.1.2. Enzimas

As enzimas são os catalisadores das reações que ocorrem nos sistemas biológicos (Lehninger et al, 1995). Uma série de enzimas é responsável pela degradação metabólica da clorofila em vegetais bioquimicamente ativos.

O catabolismo da clorofila durante a senescência, amadurecimento e outros processos degradativos culmina na acumulação de produtos incolores (NCCs, conforme Quadro 3). Uma série de enzimas participa da rota de formação de NCCs sendo a primeira e mais conhecida a clorofilase, que defitila a clorofila. Uma seqüência de reações enzimáticas e não-enzimáticas é responsável por abrir o anel tetrapirrólico e oxidá-lo até produzir os NCCs (Roca et al, 2004).

A enzima clorofilase, presente normalmente nas plantas verdes, é a principal responsável pela formação das clorofilidas, derivados da clorofila sem a cadeia fitol. As clorofilidas são solúveis em água, possuem cor verde e têm as mesmas propriedades espectrais das clorofilas. As clorofilidas que perdem o átomo de magnésio são denominadas feoforbídeos, que tem a mesma cor e propriedades espectrais das feofitinas (Wong, 1989). A remoção do magnésio pode ocorrer por via química ou enzimática, sendo esta última desencadeada pela enzima Mg-dequelatase (Matile et al, 1999).

Outro sistema enzimático, particularmente enzimas oxidativas, tem sido implicado na degradação da clorofila, destacando-se três enzimas: a) “clorofila oxidase”, a qual possui atividade dependente de oxigênio e ácidos graxos insaturados; b) lipoxigenase, que catalisa a oxidação da clorofila acoplada a uma hidroperoxidação de ácidos graxos insaturados; c) peroxidase, que na presença de fenóis simples catalisa a oxidação por meio de H₂O₂. Não há acordo, contudo, sobre o tipo de participação dessas enzimas na degradação do pigmento *in vivo* e sua relação com a clorofilase (Gandul-Rojas et al, 2004).

2.3.1.2.1. Inativação enzimática

A atividade enzimática em alimentos processados não é desejável, tendo em vista que esta pode causar uma série de alterações durante a armazenagem, entre elas a perda de clorofila. Com a finalidade de obter a inativação enzimática, é comumente aplicado antes do congelamento, secagem ou esterilização de vegetais, um processo conhecido como branqueamento (Günes & Bayindirli, 1993).

Segundo Cruz et al (2006), o método mais utilizado no branqueamento de vegetais é a aplicação de tratamento de calor, devido a sua capacidade de destruir microrganismos e inativar enzimas. Contudo, um tratamento térmico inadequado

pode deixar no produto uma atividade enzimática residual, a qual é uma das causas da perda de clorofila em alimentos processados (Martins & Silva, 2002).

Muitas enzimas têm sido sugeridas como indicadoras de um tratamento térmico suficiente, determinando a eficiência do branqueamento. No entanto, a peroxidase tem sido a mais utilizada, pois é conhecida como sendo a enzima mais resistente ao calor nos vegetais. Geralmente se aceita que quando a peroxidase é destruída é muito pouco provável que outras enzimas ainda estejam ativas (Gökmen et al, 2005). A peroxidase é uma enzima comumente encontrada nos vegetais, e pode catalisar um grande número de reações nas quais um peróxido é reduzido enquanto um doador de elétrons é oxidado (Cruz et al, 2006).

2.3.1.3. Temperatura

A primeira alteração observada quando a molécula de clorofila é exposta ao calor mediano é a isomerização. Os isômeros da clorofila se formam por inversão (epimerização) do grupo carbometoxilo do carbono C-13², do anel isocíclico. A epimerização forma os isômeros denominados *a'* e *b'*, e ocorre comumente no branqueamento de vegetais (Schwartz & Lorenzo, 1990).

A conversão de clorofila em feofitina e feoforbídeo é a causa mais comum de perda da cor verde dos vegetais processados termicamente (Wong, 1989). Tem sido proposto que a formação de feofitina durante tratamentos térmicos inicia por um aumento, induzido pelo calor, da permeabilidade dos íons hidrogênio através das membranas celulares (Fennema, 2000). Um dos meios de evitar este problema consiste em alcalinizar ligeiramente a água de cocção, porém isto acarreta em prejuízo sensorial e potencial risco microbiológico (Coulter, 1998).

O aquecimento prolongado causa descarbometoxilação no C-13² dando origem aos “piro” derivados. Pirofeofitinas são encontradas em vegetais enlatados, formados a partir da respectiva feofitina. Em alguns produtos, pirofeofitinas foram determinadas como os derivados clorofílicos predominantes (Schwartz & Lorenzo, 1990). As pirofeofitinas apresentam as mesmas propriedades espectrais das feofitinas, de forma que tem cor oliva (Fennema, 2000).

A degradação da clorofila durante o aquecimento é seqüencial: clorofila → feofitina → pirofeofitina. Diversos estudos têm demonstrado que a clorofila *b* é mais termoestável que a clorofila *a* (Fennema, 2000).

A velocidade de qualquer reação aumenta, em geral, com a temperatura e por consequência aumentar a temperatura do meio pode acelerar outros processos de degradação da clorofila (Man & Jones, 1999; Netz & Ortega, 2002).

2.3.1.4. Luz

A clorofila está protegida da destruição pela luz durante a fotossíntese nas células vegetais sãs por causa dos carotenóides e lipídeos que as rodeiam. Uma vez que se perde esta proteção durante a senescência da planta, por extração do pigmento do tecido ou por destruição celular causada pelo processamento, a clorofila é suscetível à fotodegradação. Quando prevalecem essas condições e estão presentes a luz e o oxigênio, a clorofila é descolorida irreversivelmente (Fennema, 2000).

Segundo Suzuki et al (1999), a fotodegradação da clorofila tem como resultado a oxidação e consequente abertura do anel tetrapirrólico e a sua fragmentação em compostos de peso molecular mais baixo, entre eles monopirróis, os quais são incolores e na sua maioria hidrofílicos.

2.3.1.5. Oxidação

A oxidação é a principal causa da deterioração de várias substâncias biologicamente importantes, alterando diversas propriedades, como qualidade sensorial, valor nutricional e funcionalidade. Embora a oxidação em geral tenha sua origem na fração lipídica, muitas vezes outros componentes são afetados, como proteínas, vitaminas e pigmentos (Araújo, 1997).

A oxidação da molécula de clorofila pode ocorrer em dois níveis: no anel macrocíclico ou no anel isocíclico, provocando a abertura destes. A abertura do anel isocíclico leva à produção de formas coloridas (geralmente pardas), entre elas as clorinas e as rodinas. Já a abertura do anel macrocíclico acarreta na formação de moléculas incolores, de estrutura química variada (Cheftel & Cheftel, 1992). Porém, a oxidação pode ocorrer no anel isocíclico sem sua clivagem, mas pela substituição do hidrogênio por um átomo de oxigênio ao carbono C-13² do anel. Estes pigmentos geralmente apresentam cor próxima à da molécula originária (Fennema, 2000).

A oxidação do C-13² da clorofila por oxigênio tripleto em metanol é denominada alomerização, que também ocorre em outros sistemas. Existem fortes evidências de que o mecanismo da alomerização envolva a participação de radicais livres, e sabe-se que é necessária a exposição ao ar para captação equimolecular de oxigênio pelas clorofilas presentes. A alomerização pode ocorrer por via química ou enzimática, e os principais produtos encontrados são 13²-hidroxi-clorofila *a*, 13²-metoxi-clorofila *a* e 15¹-metoxi-lactona-clorofila *a*. A presença de alômeros já foi verificada em preparações de clorofila, vegetais processados, frutas verdes, sedimentos superficiais de lagos e plantas senescentes (Mínguez-Mosquera & Gandul-Rojas, 1995; Hyvarinen & Hynninen, 1999; Fennema, 2000).

Quando a alomerização ocorre em meio ácido ou levemente alcalino, o anel isocíclico pode ser aberto. Os compostos resultantes desta transformação são as chamadas clorinas e rodinas, originárias das clorofilas *a* e *b*, respectivamente (Mínguez-Mosquera et al, 1996).

A clivagem do anel macrocíclico leva à formação de produtos incolores fluorescentes, chamados FCCs, através de uma reação de oxidação enzimática. Os FCCs são tetrapirróis lineares, derivados do feoforbídeo *a*, os quais são precursores dos NCCs, sendo que os últimos, além de serem incolores, não possuem fluorescência (Matile, 2000).

É possível que FCCs e NCCs estejam relacionados com a perda de cor e clorofila através de oxidação não enzimática. Segundo Heaton & Marangoni (1996), os pesquisadores não tem procurado pela presença desses compostos em vegetais processados por serem incolores, não afetando diretamente a qualidade do alimento. A pesquisa da degradação da clorofila em alimentos processados tem se concentrado basicamente no desaparecimento da clorofila e/ou na acumulação de catabólitos primários, como feofitina e feoforbídeo.

2.3.1.6. Atividade de água (Aa)

A atividade de água é uma medida da disponibilidade de água para processos em um determinado produto (Cheftel & Cheftel, 1992). Diferentes tipos de reações em alimentos são aceleradas ou minimizadas em função da atividade de água devido à maior ou menor mobilidade das moléculas (Rockland & Beuchat, 1987). Na degradação da clorofila, a água disponível pode ser um agente limitante, protetor ou

acelerador das reações citadas na seção 2.3.1, conferindo a predominância de uma ou de outra reação em determinado momento (Figura 7).

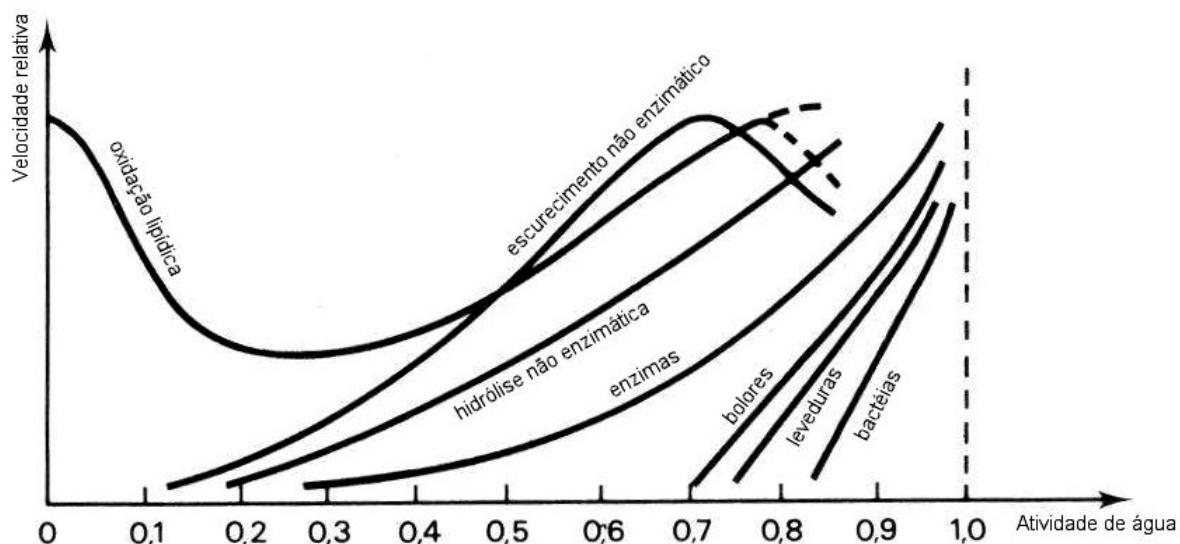


Figura 7 – Representação esquemática das possibilidades de deterioração de alimentos em relação à atividade de água. Fonte: adaptado de Cheftel & Cheftel, 1990).

Diversos estudos têm investigado a degradação da clorofila durante processamento e armazenagem, mas pouco se sabe a respeito do comportamento deste pigmento em sistemas com baixa atividade de água, como vegetais desidratados (Jayaraman & Das Gupta, 1995; Negi & Roy, 2001).

Lajolo et al (1971) realizaram um dos primeiros estudos da degradação da clorofila em baixa atividade de água, utilizando purê de espinafre desidratado. A 37°C e A_w maior que 0,32, o mecanismo mais importante de degradação da clorofila foi a conversão em feofitina. No entanto, em A_w inferiores a 0,32 a taxa de feofitinação foi baixa, porém houve perda de clorofila, o que provavelmente ocorreu através de outro mecanismo. No mesmo estudo, a clorofila *a* pura foi submetida às mesmas condições e convertida a feofitina mais rápido que nas amostras de espinafre. Isto indicaria uma proteção *in vivo* contra a degradação, provavelmente por causa da associação da clorofila com proteínas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Amostras

O produto erva-mate tipo chimarrão (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.) utilizado no presente experimento foi fornecido por ervateira da região Noroeste do Rio Grande do Sul. Constituiu-se de uma mistura de matérias-primas de procedência nativa e reflorestada, de diferentes regiões produtoras, conforme o Quadro 4:

Matéria-prima	Porcentagem (%)
Erva-mate nativa da região de Rio Negrinho (SC)	44
Erva-mate nativa da região de São Mateus do Sul (PR)	38
Erva-mate cultivada da Argentina	14
Palito de erva-mate	4

Quadro 4 – Composição da amostra de erva-mate tipo chimarrão utilizada no experimento.

O produto foi acondicionado na própria ervateira em dois tipos de embalagens utilizadas comercialmente, com capacidade de 1 kg cada: papel de dupla camada (papel couché e papel apergaminhado), e estrutura laminada (polipropileno biorientado metalizado / polietileno de baixa densidade).

As amostras foram processadas dia 15/09/2006, e foram entregues pela própria ervateira no dia 18/09/2006, no Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (DTCA) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). No mesmo dia, uma parte das amostras foi destinada para a armazenagem e outra para a realização imediata das análises descritas no item 3.2.2. Esta fração da amostra foi considerada com tempo zero de armazenagem.

3.2. Métodos

3.2.1. Armazenagem

As amostras de erva-mate em embalagem laminada e em embalagem de papel foram distribuídas em uma câmara, detalhada no item 3.2.1.1, de forma homogênea e de uma só vez. A cada duas semanas de armazenagem, seis unidades de erva-mate eram retiradas aleatoriamente da câmara, três de cada embalagem, para serem submetidas às metodologias descritas no item 3.2.2. Ao todo, houve sete períodos de armazenagem: zero, duas, quatro, seis, oito, dez e doze semanas.

A umidade relativa (UR) dentro da câmara foi mantida em 75% ($\pm 5\%$) e a temperatura média foi de 25°C ($\pm 2,5^\circ\text{C}$). A temperatura e umidade relativa escolhidas estão de acordo com trabalhos que simularam condições ambientais de armazenagem de erva-mate (Santos, 2004; Valduga et al, 2005) e de outros vegetais verdes desidratados (Lajolo et al, 1971; Lajolo et al, 1982), e com o proposto para estudos de vida-de-prateleira por Man & Jones (1999).

3.2.1.1. Câmara de armazenagem

A câmara de armazenagem utilizada pertence ao Núcleo de Pesquisa em Pós-Colheita (NPP) do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Constituiu-se de um compartimento em formato de caixa retangular, com temperatura e umidade específicas, o qual encontra-se no interior de uma câmara de climatização com capacidade de 37 m³ e temperatura controlada a 20°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$). De construção artesanal, a câmara de armazenagem apresenta as seguintes dimensões: 1,66 m de largura, 0,69 m de altura e 0,72 m de profundidade (0,82 m³). Sua estrutura é composta por arestas de ferro, piso de madeira, teto de poliuretano e paredes cobertas com lona plástica preta. Devido à diferença de temperatura entre a câmara maior e a menor e à pequena capacidade de isolamento térmico das paredes e do piso desta, um mecanismo de aquecimento foi instalado dentro da câmara de armazenagem para manter a temperatura desejada.

Dentro da câmara de armazenagem foi gerado calor por uma resistência ligada a um microventilador e um termostato. O termostato manteve a temperatura na faixa 22,5°C a 27,5°C, fazendo com que a resistência ligasse e desligasse automaticamente, conforme necessário. O microventilador ligava concomitantemente para evitar superaquecimento da resistência e também contribuía com o espalhamento do calor dentro da câmara. Os ciclos de aquecimento eram de

aproximadamente 3 minutos de resistência ligada seguidos por 15 minutos de pausa e assim sucessivamente. A temperatura foi monitorada diariamente através de seis termômetros de mercúrio espalhados no interior da câmara.

O monitoramento da umidade foi feito por meio de um psicrômetro do tipo não-aspirado. Para chegar aos níveis desejados de umidade, foram utilizadas duas bandejas de 45 cm x 30 cm com cerca de 1,5 L de água cada. Dessa forma, a umidade relativa manteve-se em 75% ($\pm 5\%$).

As amostras foram acomodadas na câmara em prateleiras construídas com pés de madeira e grades de metal e dispostas em dois níveis, de maneira uniforme, de forma a permitir a convecção do ar. Cada pacote de erva-mate foi colocado deitado sobre uma das faces laterais menores, com distância de aproximadamente 4 cm um do outro. O espaço livre mínimo entre as amostras e as superfícies da câmara foi de 8 cm.

Dentro da câmara de armazenagem não havia fonte de luz, somente permitida na câmara de climatização. A incidência de luz sobre as amostras foi impedida pela lona plástica preta que recobria a câmara de armazenagem. Dessa forma, foi descartada interferência da luz na deterioração dos constituintes da erva-mate, entre eles os pigmentos clorofílicos.

3.2.2. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas nos laboratórios do DTCA, iniciadas imediatamente após a retirada das amostras da câmara de armazenagem.

Entre uma análise e outra, as amostras foram armazenadas em refrigerador doméstico, a 5°C, dentro de placas de Petry e ao abrigo da luz.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.2.1. Preparação das amostras

Previamente à execução das análises, a erva-mate foi peneirada para a remoção dos palitos (fragmentos secos de ramos), com exceção da determinação de umidade, atividade de água e pH, as quais foram realizadas com amostra integral. A peneiração foi realizada manualmente, utilizando-se peneira de ensaio com abertura de malha de 800 μm .

3.2.2.2. Umidade

De acordo com o método proposto pelo Instituto Adolfo Lutz (1985), a determinação de umidade foi feita em estufa à temperatura de 105°C, por um período de 6 horas.

3.2.2.3. Atividade de água

Para a determinação da atividade de água (Aa) utilizou-se medidor de umidade Testo 650, equipado com sensor para medição simultânea de temperatura e umidade. O procedimento de análise seguiu o método especificado pelo fabricante, com tempo de estabilização de 20 minutos por amostra.

3.2.2.4. pH

O pH foi determinado utilizando-se o método recomendado pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Alíquotas de 10 g de erva-mate foram pesadas e transferidas para Erlenmeyers secos de 250 mL, juntamente com 100 mL de água destilada à temperatura ambiente. O conteúdo dos frascos foi agitado até que as partículas ficassem uniformemente suspensas. Agitou-se, ocasionalmente, durante um período de 30 min, e após decantou-se o sobrenadante para um frasco seco e imediatamente procedeu-se à leitura do pH. Para tal utilizou-se medidor de pH com termocompensador automático, calibrado a cada uso com as soluções padrões adequadas.

3.2.2.5. Substâncias reativas ao TBA (TBARS)

O nível de peroxidação lipídica foi verificado através da presença de substâncias reativas ao TBA (ácido 2-tiobarbitúrico); entre elas está o malondialdeído, um dos principais subprodutos da peroxidação lipídica. Tomando por base a metodologia descrita por Egert & Tevini (2002), foram homogeneizados

0,9 g de erva-mate com 9 mL de TCA 0,1% e 1 mL de BHT metanólico (0,5 g/L) em um agitador de tubos, por 1 minuto, dentro de tubos de centrífuga. Em seguida, o homogeneizado foi submetido à centrifugação, a 3000 rpm, durante 20 min. Após, 1 mL do sobrenadante foi adicionado a 4 mL de TCA 20% contendo TBA 0,5%, e essa mistura incubada por 30 min em banho-maria a 95°C. Ao término disso, a reação foi paralisada por meio de um banho-de-gelo (5 min) e em seguida realizada nova centrifugação (3000 rpm, 10 min). A absorção do sobrenadante a 532 nm foi medida subtraindo-se a absorção não-específica a 600 nm, em espectrofotômetro UV/Vis. A concentração de TBARS (nmol/g b.s.) foi calculada usando-se o coeficiente de extinção do malondialdeído: $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.2.2.6. Atividade residual da peroxidase

Utilizada como teste da eficiência da inativação enzimática pelo tratamento térmico (sapeco) e para verificação de possível regeneração da peroxidase durante a armazenagem. A atividade residual foi determinada espectrofotometricamente medindo-se a variação da absorbância a 475 nm, comprimento de onda de máxima absorção do tetraguaiacol (produto oxidado do guaiacol), que se forma na reação enzimática. Tomou-se como base o método de Argüello et al (1999). Para a execução desta técnica, foi necessário preparar previamente a solução com os substratos da enzima e obter um extrato enzimático bruto da amostra para, a seguir, dar procedimento ao ensaio enzimático.

3.2.2.6.1. Preparação da solução substrato

A solução substrato, utilizada no item 3.2.2.6.3, foi preparada, no dia de análise, pela adição de 0,2% de peróxido de hidrogênio 35% e 1% de guaiacol puro a um balão volumétrico de 200 mL, tendo o volume completado com solução tampão fosfato. O tampão fosfato foi preparado com fosfato de sódio monobásico monohidratado e fosfato de sódio bibásico heptahidratado em água destilada, obtendo-se uma concentração de 0,1M e pH 5,15. A solução tampão foi armazenada a 5°C até o uso.

3.2.2.6.2. Obtenção do extrato enzimático bruto

Foram trituradas 7 g de erva-mate em 100 mL de água destilada gelada (< 5°C), durante 1 min, utilizando-se um mixer vertical doméstico. O homogeneizado foi filtrado em gaze e posteriormente centrifugado a 3.000 rpm durante 20 min, em tubos de vidro. A solução sobrenadante foi denominada extrato enzimático bruto e utilizada em seguida na determinação da atividade enzimática. A extração foi realizada em triplicata.

3.2.2.6.3. Ensaio da atividade peroxidásica

A atividade residual da enzima peroxidase foi medida pela adição de 200 µL de extrato enzimático a 2,8 mL de solução substrato, diretamente na cubeta do espectrofotômetro, a temperatura ambiente. O aumento na absorbância a 475 nm foi monitorado em intervalos de 1 min, durante 5 minutos, utilizando-se cubeta de vidro de 1 cm de largura e espectrofotômetro UV/Vis. A taxa de aumento de absorbância foi convertida em taxa de conversão de substrato em produto (formação de tetraguaiacol). Uma unidade de atividade da peroxidase (U.POD) foi definida como a mudança em 0,001 unidade de absorbância por minuto e por miligrama de material seco. Como branco, foi utilizada água no lugar do extrato enzimático. Como controle, a reação foi realizada na ausência de peróxido de hidrogênio. As amostras foram mantidas em banho-de-gelo até a medida de atividade.

3.2.2.7. Determinação da concentração de pigmentos clorofílicos

A extração dos pigmentos clorofílicos da erva-mate foi efetuada adaptando-se o método de Yamauchi et al (1997) e a determinação da concentração de pigmentos clorofílicos foi realizada espectrofotometricamente segundo proposto por Moran (1982).

3.2.2.7.1. Extração dos pigmentos clorofílicos

Os pigmentos foram extraídos por maceração de 0,25 g de amostra com gral de porcelana e pistilo, na presença de solvente, durante um minuto. A suspensão foi

filtrada em papel filtro (25 μm) e o volume completado para 50 mL. De acordo com Moran (1982), o solvente escolhido foi N,N-dimetilformamida (DMF).

3.2.2.7.2. Determinação da concentração de clorofila e feofitina

A determinação da concentração de clorofila (*a*, *b* e total) e feofitina (*a*, *b* e total) da erva-mate foi efetuada conforme método proposto por Moran (1982). Após obtenção dos filtrados (item 3.2.2.7.1), procedeu-se imediatamente a leitura em espectrofotômetro UV/Vis (Spectrum 22ED) a 647, 654, 664 e 666 nm. A concentração dos pigmentos foi calculada aplicando-se os valores de absorvância obtidos às fórmulas abaixo, desenvolvidas por Moran (1982):

$$\begin{aligned} [\text{clorofila } a] &= 12,64 A_{664} - 2,99 A_{647} \\ [\text{clorofila } b] &= - 5,6 A_{664} + 23,26 A_{647} \\ [\text{clorofila total}] &= 7,04 A_{664} + 20,27 A_{647} \\ \\ [\text{feofitina } a] &= 23,91 A_{666} - 7,22 A_{654} \\ [\text{feofitina } b] &= - 16,38 A_{666} + 37,41 A_{654} \\ [\text{feofitina total}] &= 7,53 A_{666} + 30,19 A_{654} \end{aligned}$$

A concentração dos pigmentos foi expressa em mg/g amostra (b.s.).

3.2.2.8. Determinação instrumental de cor

Os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* foram obtidos através de um colorímetro *tristimulus* Minolta CR 310, operando no sistema CIELAB, em que L^* corresponde à luminosidade e a^* e b^* são as coordenadas de cromaticidade ($-a$ = verde e $+a$ = vermelho; $-b$ = azul e $+b$ = amarelo). O colorímetro foi calibrado com uma placa branca padrão ($Y = 93,5$; $x = 0,3164$; $y = 0,3325$), conforme instruções do fabricante. Previamente às leituras de cor, as amostras de erva-mate peneiradas (conforme item 3.2.2.1) foram acondicionadas e compactadas em placas de Petry (cerca de 45g cada). As leituras foram realizadas em triplicata, sob iluminante D65 e ângulo 10° .

Várias funções de cor foram determinadas para cada amostra: ângulo de matiz (h°) foi calculado como $180^\circ + \arctan(b^*/a^*)$; croma ou índice de saturação (C^*) como $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$; e diferença total de cor (ΔE^*) como $(\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$ (Schmalko e Alzamora, 2001).

3.2.3. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 7 (embalagem de papel e laminada x sete períodos de armazenagem - 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 semanas), com três repetições. A unidade experimental foi 1kg de erva-mate. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo verificado o efeito da interação e de cada fator pelo teste F ($p < 0,05$). Como análise complementar, utilizou-se o teste de Tukey para comparação de médias (ao nível de 5% de significância). Para investigar possíveis relações entre as variáveis em estudo, realizou-se análise de correlação linear simples. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software The SAS System for Windows 6.11.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Variação da umidade, atividade de água, pH, enzimas e oxidação durante armazenagem da erva-mate em condições ambientais, nas embalagens papel e laminada

4.1.1. Umidade e atividade de água

Observou-se, para as amostras de erva-mate que houve absorção de umidade do ambiente durante o período de armazenagem, conforme a Figura 8A. Segundo Ramallo & Albani (2004), a força motriz do transporte de água em alimentos embalados é a diferença de pressão de vapor entre os lados interno e externo da embalagem. Nas amostras de erva-mate a atividade de água inicial, conforme a Figura 8B, foi de $0,40 \pm 0,01$ (gerando uma UR de $40 \pm 1\%$ no interior das embalagens), o que impulsionou absorção de umidade do ambiente, onde a UR era de $75 \pm 5\%$. No entanto, o ganho de umidade depende das propriedades particulares do alimento e da permeabilidade da embalagem (Ramallo & Albani, 2004).

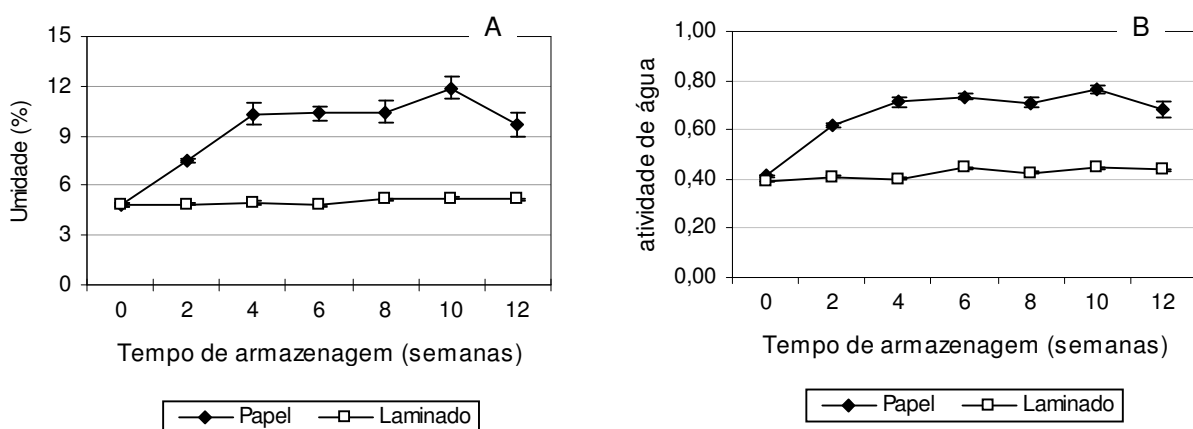


Figura 8 – Variação do teor de umidade (A) e da atividade de água (B) em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem. Os dados mostrados representam a média de três repetições \pm o desvio padrão.

A análise de variância (ANOVA) mostrou que a absorção de umidade foi significativamente influenciada pelo tempo de armazenagem e pela embalagem, com

$p < 0,01$ (Apêndice F). A absorção das amostras em embalagem de papel foi nitidamente maior que das amostras em embalagem laminada. Isto é confirmado pelo fato de que, para a embalagem laminada, não houve variação significativa ($p < 0,05$) de umidade no período de tempo estudado (Apêndice A), ao contrário da embalagem de papel, que mostrou grande variação nas primeiras quatro semanas, sendo que a partir da quarta semana houve uma tendência para estabilização ($p < 0,05$; Apêndice A).

Após um determinado momento, um material higroscópico entra em equilíbrio com o meio, não absorvendo mais umidade (Ramallo & Albani, 2003), o que provavelmente aconteceu a partir da quarta semana na embalagem de papel. Porém, nos dois últimos períodos de análise, houve uma oscilação significativa, o que pode ter ocorrido por variação na umidade e/ou temperatura no interior da câmara.

Da mesma forma, a atividade de água mostrou tendência de aumento durante a armazenagem, tendo sido significativamente influenciada pelo tempo de armazenagem e pela embalagem, conforme a análise de variância (Apêndice G) e a Figura 8B.

Na embalagem de papel, houve diferença significativa na atividade de água entre as três primeiras medições, as quais foram seguidas por relativa estabilização até a décima semana, quando houve uma oscilação, provavelmente pelos mesmos motivos da verificada na umidade (Apêndice A). Já para a embalagem laminada, só apareceu elevação significativa na sexta semana e a partir da décima (Apêndice A).

Verificou-se elevada correlação entre o teor de umidade e a atividade de água nos tratamentos em estudo ($r = 0,99$; $p < 0,01$), o que é esperado pelo fato de que a atividade de água se eleva pela absorção de umidade. Entretanto, ressalta-se o fato de que, para a embalagem laminada não houve diferença significativa para a umidade, mas houve para a atividade de água no mesmo período. Isto pode estar relacionado à não linearidade da relação entre umidade e atividade de água, que é representada graficamente pelas isotermas de sorção (Cheftel & Cheftel, 1990).

As isotermas de sorção são curvas que indicam a umidade em função da atividade de água de uma amostra a uma dada temperatura. São determinadas partindo-se de um alimento úmido ou seco, até sua desidratação ou hidratação, respectivamente. Assim, se obtém isotermas de dessorção ou adsorção (Cheftel & Cheftel, 1990). Mazza & Schmalko (2006) obtiveram isotermas de adsorção para a

erva-mate em diferentes tempos de armazenagem. Os seus resultados mostraram que ao redor de uma atividade de água de 0,4, a inclinação da curva favorece um aumento acentuado da atividade de água com pequenos ganhos de umidade. Isto é coerente com a amostra de erva-mate em embalagem laminada, em que a elevação da umidade não foi significativa, porém a da atividade de água foi.

Valduga et al (2005) armazenaram amostras de erva-mate em embalagem de papel e laminada durante 120 dias, em condições ambientais, a fim de estudar a vida-de-prateleira do produto. Foi verificado comportamento semelhante ao obtido neste trabalho, tanto para umidade quanto para atividade de água.

Uma maior ou menor penetração de umidade do ambiente para o interior da embalagem é determinada por sua permeabilidade à água, a qual é medida objetivamente pela taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA), dada em $g\ m^2/dia$ (Man & Jones, 1999). Em pesquisa com embalagens de erva-mate, Ramallo & Albani (2003) encontraram valores de TPVA para filmes plásticos significativamente menores que para embalagem de papel, o que resultou em uma mais rápida absorção de umidade pela embalagem de papel que pelos filmes plásticos.

O ganho de umidade determina a atividade de água, porém esta é que dá real noção da probabilidade de reações de degradação nos alimentos. A maioria das reações de degradação tem sua velocidade aumentada com a elevação da atividade de água (Rockland & Beuchat, 1987).

4.1.2. pH

O pH, durante o período total de armazenagem, apresentou tendência de redução para as amostras das duas embalagens estudadas (Figura 9), de forma que o tempo teve influência significativa ($p < 0,05$; Apêndice H). Reações complexas que ocorrem durante a armazenagem de vegetais desidratados, como o escurecimento não-enzimático, tendem a tornar o pH mais ácido (Lajolo et al, 1971; Barbosa-Canovas et al, 1996).

A embalagem também influenciou significativamente, a qual ocasionou valores de pH inferiores significativamente a partir da quarta semana para a embalagem de papel, em relação à laminada ($p < 0,05$; Apêndice A). A correlação entre pH e atividade de água ($r = - 0,83$; $p < 0,01$) justifica menores valores de pH

para a embalagem de papel, a qual teve atividade de água maior que a embalagem laminada. Percebeu-se comportamento semelhante no trabalho de Lajolo et al (1971), que verificaram diminuição do pH com o aumento da atividade de água em armazenagem de purê de espinafre desidratado.

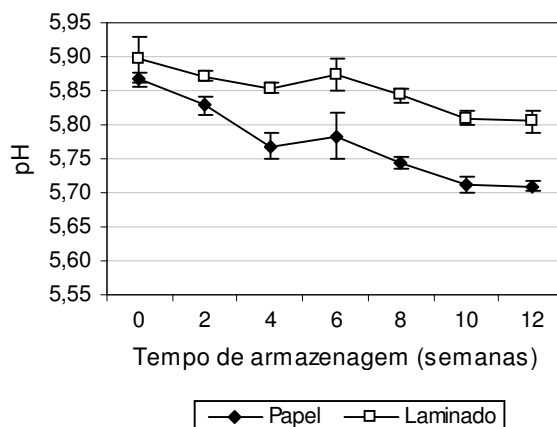


Figura 9 – Variação do pH em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem. Os dados mostrados representam a média de três repetições \pm o desvio padrão.

Santos (2004) encontrou uma média de 5,90 para o pH em erva-mate embalada em embalagens plásticas durante 180 dias em condições similares, porém este não variou significativamente durante o período de armazenagem.

4.1.3. Oxidação (TBARS)

A formação de substâncias reativas ao TBA na erva-mate pode ser observada na Figura 10. A concentração de TBARS variou significativamente ($p < 0,01$) com o tempo de armazenagem do produto nas duas embalagens, conforme a análise de variância no Apêndice H. A embalagem também teve influência significativa ($p < 0,01$), de forma que a elevação que ocorreu durante a armazenagem foi estatisticamente maior para a embalagem laminada que para a embalagem de papel ($p < 0,05$; Apêndice A).

A quantificação de TBARS é o método preferido para medir a extensão geral da oxidação lipídica em sistemas biológicos. O teste fundamenta-se na formação de um complexo de coloração vermelha, resultante da condensação de duas moléculas do ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído (Araújo, 1997). O

malondialdeído (MDA) é um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo (Osawa et al, 2005). No entanto, vários outros produtos resultantes da oxidação de lipídios podem reagir com o TBA, sendo por este motivo que se utiliza a expressão TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Araújo, 1997).

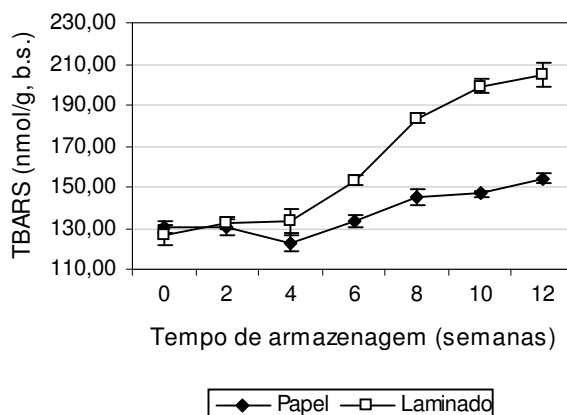


Figura 10 – Variação do teor de TBARS em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem. Os dados mostrados representam a média de três repetições \pm o desvio padrão.

De um modo geral, substâncias reativas ao TBA (em especial o malondialdeído) são produzidas em quantidades substanciais somente a partir de ácidos graxos contendo três ou mais insaturações (Araújo, 1997). Tal configuração está presente nos lipídios da membrana tilacóide dos cloroplastos, as quais são basicamente constituídas dos ácidos graxos linolênico e linoléico, sendo que o ácido linolênico possui três insaturações (Heaton & Marangoni, 1996).

Maiores concentrações de TBARS indicam um maior nível de peroxidação lipídica. O aumento durante a armazenagem de erva-mate era esperado por ser a oxidação lipídica uma reação de degradação importante na armazenagem de vegetais desidratados (Jayaraman & Das Gupta, 1995; Lopez-Ayerra et al, 1998; King et al, 2001). Porém, valores estatisticamente diferentes dos iniciais ($p < 0,05$) só foram percebidos a partir da sexta semana para a embalagem laminada e da oitava semana para a de papel (Apêndice A). Os aldeídos (entre eles o MDA) são produtos secundários da oxidação lipídica, de forma que as reações oxidativas que sucedem a formação destes podem ter iniciado semanas antes que a concentração de TBARS se elevasse significativamente.

O Teste de Tukey (Apêndice A) mostra que a partir da sexta semana de armazenagem a concentração de TBARS da embalagem laminada foi significativamente superior à da embalagem de papel ($p < 0,05$), o que significa que a oxidação na embalagem laminada foi maior. Considerando que as amostras das duas embalagens foram expostas às mesmas condições, e a erva-mate era originária de um mesmo lote, as principais diferenças entre as embalagens que poderiam ocasionar esta diferença significativa estão na atividade de água e na taxa de permeabilidade ao oxigênio.

A disponibilidade de oxigênio é um dos fatores que influencia na velocidade da oxidação lipídica, pois este elemento participa na maioria das reações envolvidas (Cheftel & Cheftel, 1990). Em alimentos embalados, a taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO_2) determina a absorção deste elemento pelo produto no interior da embalagem, sendo expresso em $\text{cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}/\text{atm}$, à temperatura e umidade definidas. Os polímeros mais utilizados para erva-mate são o polietileno de baixa densidade e o polipropileno biorientado. O primeiro possui alta permeabilidade a gases, e o segundo é moderadamente permeável, de forma que nenhum dos dois é recomendado para utilização isolada em alimentos suscetíveis a oxidação. No entanto, a laminação e metalização dos filmes flexíveis melhoram substancialmente a propriedade de barreira ao oxigênio desses materiais, diminuindo consideravelmente a TPO_2 . Por outro lado, a embalagem de papel kraft e monolúcido utilizada para erva-mate apresenta alta permeabilidade a gases (Man & Jones, 1999; Santos, 2004). Desse modo, a TPO_2 não deve ser o motivo da maior oxidação na embalagem laminada.

A influência da atividade de água na velocidade da oxidação lipídica também parece contradizer o resultado obtido. Segundo Fennema (2000), a atividade de água da embalagem laminada, favorece menos a oxidação lipídica do que a atividade de água da erva-mate na embalagem de papel, pois na faixa de 0,4 a 0,7, o aumento da atividade de água leva a aumento da velocidade da reação de oxidação lipídica. Uma maior atividade de água aumenta a mobilidade de metais de transição, que são pró-oxidantes. Dessa forma, a erva-mate da embalagem de papel seria a mais oxidada.

Duas hipóteses podem ser levantadas com base na literatura para explicar este resultado. A primeira baseia-se na diferença entre os sistemas de fechamento das embalagens e a segunda na possibilidade de a reação de Maillard ter sido

favorecida pela absorção de umidade. As duas hipóteses podem ter atuado isoladamente ou em conjunto.

No momento do fechamento, a embalagem de papel é dobrada de maneira ajustada ao volume do produto. Já a embalagem laminada é lacrada termicamente, permitindo a formação de um espaço livre visivelmente maior, e conseqüentemente retenção de um volume de oxigênio maior que na embalagem de papel. Situação semelhante ocorreu no trabalho de Santos (2004), no qual a embalagem com menor permeabilidade ao oxigênio apresentou menor efeito protetor frente à oxidação devido ao grande espaço livre no interior da embalagem ocasionado pela rigidez do material.

A segunda hipótese baseia-se no fato de que a elevação da atividade de água nas amostras em embalagem de papel favorece a reação de Maillard, a qual tem efeito antioxidante. Diversos estudos comprovaram que produtos dessa complexa reação, principalmente os intermediários, que são incolores, têm a capacidade de retardar a oxidação lipídica (Rockland & Beuchat, 1987). No entanto, os mecanismos e moléculas envolvidas ainda não são bem conhecidos (Morales & Jiménez-Pérez, 2001).

4.1.4. Atividade residual da peroxidase

O tratamento térmico para inativação enzimática em vegetais muitas vezes permite uma atividade residual de 3-10% da peroxidase, tendo em vista sua alta resistência ao calor (Günes & Bayindirli, 1993). Além disso, a inativação térmica da peroxidase pode ser reversível e a enzima pode recuperar sua atividade sob certas condições (Bahçeci et al, 2005). No entanto, nenhuma atividade peroxidásica foi observada nas amostras de erva-mate recém processadas (tempo zero de armazenagem) e aparentemente não houve recuperação de atividade ao longo do tempo (dados não mostrados).

Genericamente, a atividade enzimática minimiza ou cessa em valores de atividade de água entre 0,2 e 0,4; acima deste valor, a atividade das enzimas tende a aumentar (Rockland & Beuchat, 1987). No entanto, mesmo na embalagem de papel, onde a atividade de água aumentou durante a armazenagem, não foi percebida atividade residual da enzima.

O sapeco, etapa do processamento da erva-mate, tem por objetivo a inativação enzimática. No entanto, a verificação da inativação enzimática é basicamente empírica. Os trabalhos encontrados que verificam atividade enzimática em erva-mate utilizam folhas frescas, e não o material processado (Argüello et al, 1999; Ceni, 2005).

4.2. Variação da concentração de pigmentos clorofílicos (clorofila e feofitina) durante armazenagem da erva-mate em condições ambientais, nas embalagens papel e laminada

4.2.1. Clorofila (*a*, *b* e total)

A concentração de clorofila total no tempo zero para o lote de erva-mate foi de $4,02 \pm 0,02$ mg/g (b.s.). A literatura apresenta valores de 0,51 a 6,04 mg/g (b.s.) para clorofila total em erva-mate com tempo zero armazenagem (Morawicki et al, 1999; Schmalko & Alzamora, 2001; Santos, 2004), de forma que o valor obtido neste trabalho encontra-se dentro deste intervalo. A expressiva diferença entre as concentrações dadas pelos autores deve-se a diferenças na origem da matéria-prima (região, tipo de erval), processamento, método de quantificação, tempo entre processamento e análise, entre outras, tendo em vista a instabilidade da clorofila.

A razão entre clorofila *a* e *b* inicialmente foi de 2,79:1, devido às concentrações de clorofila *a* e *b* no tempo zero terem sido de $2,96 \pm 0,03$ e $1,06 \pm 0,01$ mg/g (b.s.), respectivamente. Schmalko et al (2005) obtiveram razões entre 1,75:1 e 2,52:1 e argumentaram que as folhas de erva-mate sofrem tratamentos térmicos no processamento e, conseqüentemente, a razão encontrada é diferente daquela existente em folhas frescas (3:1). Segundo Schwartz & Lorenzo (1990), mesmo em folhas verdes podem ser encontradas razões de 2,56:1 a 3,45:1, de forma que 3:1 é um valor convencionado como média entre as plantas superiores.

A variação da concentração da clorofila (*a*, *b* e total) nas amostras de erva-mate armazenadas pode ser observada na Figura 11. A análise de variância mostra influência significativa do tempo e da embalagem sobre os pigmentos analisados ($p < 0,01$), conforme os Apêndices P, Q e R.

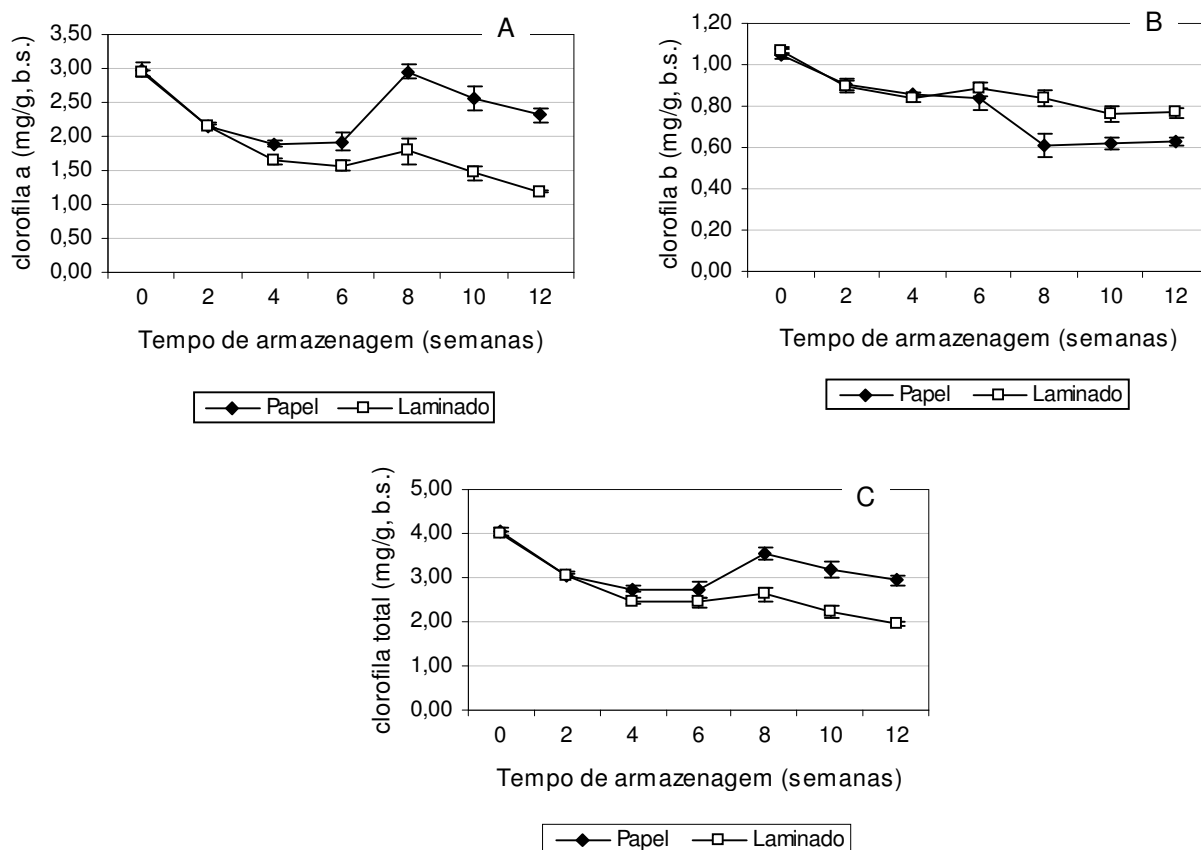


Figura 11 – Variação da concentração de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) e clorofila total (C) em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem. Os dados mostrados representam a média de três repetições \pm o desvio padrão.

Notadamente a partir da oitava semana, observaram-se resultados inesperados para os pigmentos clorofílicos na embalagem de papel, principalmente para clorofila *a* e total. A literatura prevê uma redução exponencial da clorofila durante a armazenagem (Canjura et al, 1991; Steet & Tong, 1996; Morawicki et al, 1999). No entanto, o resultado obtido foi um aumento significativo na concentração do pigmento *a* a partir da oitava semana ($p < 0,05$; Apêndice D). Isso pode ter ocorrido por interferência de outros pigmentos formados durante a armazenagem da erva-mate, desde que apresentem absorção nos comprimentos de onda utilizados para o cálculo dos pigmentos clorofílicos, o que é permitido pelas limitações da espectrofotometria (Berset & Caniaux, 1983). Portanto, optou-se por não discutir a variação da clorofila durante a armazenagem em embalagem de papel, por não se conhecer a extensão da possível interferência.

Apesar da falta de subsídios da literatura com relação à erva-mate, acredita-se que se reuniram condições ideais de substrato, atividade de água e tempo para o desencadeamento da reação de escurecimento não enzimático (ou reação de Maillard) na erva-mate armazenada em embalagem de papel (Cheftel & Cheftel, 1992; Jayaraman & Das Gupta, 1995). Reforçam esta hipótese os resultados da análise de TBARS, que também apresentaram indícios de que tenha ocorrido reação de Maillard na erva-mate embalada em papel no decorrer da armazenagem.

O pico da velocidade da reação de escurecimento não-enzimático ocorre em atividades de água entre 0,55 e 0,7 (Rockland & Beuchat, 1987). Esses valores estão mais próximos da atividade de água encontrada na erva-mate em embalagem de papel a partir de duas semanas de armazenagem. Já a erva-mate na embalagem laminada manteve-se abaixo deste intervalo por todo o período. Isso sugere que o comportamento inesperado do gráfico da concentração de clorofila possa ter sido causado pela interferência dos pigmentos formados na reação de Maillard.

Outra hipótese para o comportamento da clorofila reside no fato de que a feofitina pode ser revertida a compostos com as mesmas características espectrais da clorofila pela complexação de cobre ou zinco no lugar dos hidrogênios no anel porfirínico, o que foi percebido durante a armazenagem de purê vegetal e em outros sistemas alimentares. Tal fato poderia explicar o aumento na absorbância e conseqüentemente na concentração de clorofila no gráfico da embalagem de papel onde se esperava redução. Contudo, a formação de complexos metálicos de feofitina ocasiona um reverdecimento do produto, que teria reflexos na análise de cor, o que não foi observado. Por isso descarta-se esta possibilidade, pois não houve correlação entre a variação inesperada da clorofila e as medidas de cor ($p > 0,05$) (Schwartz & Lorenzo, 1990; Fennema, 2000).

Na erva-mate em embalagem laminada houve uma queda de 59,5% na concentração de clorofila *a* e de clorofila *b* de apenas 28,04% ao final do período de armazenagem. Para Schmalko et al (2005) a perda de clorofila *b* também teve menor extensão que a de clorofila *a* em amostras de erva-mate armazenadas, de forma que a taxa de degradação da clorofila *a* foi maior que a da clorofila *b* para todos os valores de atividade de água estudados (0,1 a 0,8).

O teste de Tukey (Apêndice D) aponta redução significativa estatisticamente para clorofila *a*, *b* e total em função do tempo, principalmente nas quatro primeiras

semanas de armazenagem ($p < 0,05$). A Figura 11 mostra uma redução exponencial da concentração de clorofila *a*, *b* e total em função do tempo de armazenagem, o que é previsto pela literatura. No trabalho de Santos (2004) a degradação das clorofilas *a*, *b* e total também foi gradual e com efeito significativo do tempo em erva-mate embalada em material similar.

Diversas reações podem levar à degradação da clorofila na erva-mate nas condições em estudo, entre elas a feofitinação e a oxidação, as quais produzem derivados com características espectrais diferentes do pigmento-mãe (Lajolo & Lanfer-Marquez, 1982; King et al, 2001; Santos, 2004).

4.2.2. Feofitina (*a*, *b* e total)

Assim como ocorreu com a clorofila, a forma *a* da feofitina apareceu em maior proporção do que a feofitina *b* nas amostras de erva-mate no tempo zero de armazenagem: $4,58 \pm 0,04$ mg/g (b.s.) e $2,18 \pm 0,03$ mg/g (b.s.), respectivamente. A feofitina total, que é a soma das duas formas, resultou numa concentração de $6,76 \pm 0,07$ mg/g (b.s.). A razão entre feofitina *a* e *b* foi igual a 2,10:1.

A feofitina presente na amostra antes da armazenagem deve-se à degradação da clorofila que ocorre no processamento da erva-mate. Schmalko & Alzamora (2001) verificaram uma perda durante o processamento de cerca de 90% da clorofila originalmente presente nas folhas, a qual foi majoritariamente atribuída à formação de feofitina.

A variação da concentração da feofitina (*a*, *b* e total) em função do tempo pode ser observada na Figura 12. A análise de variância indica efeito significativo do tempo e da embalagem sobre a concentração de feofitina ($p < 0,01$), conforme os Apêndices S, T e U.

Pode-se observar que nas amostras em embalagem de papel as feofitinas *a* e total apresentaram até a sexta semana redução e a partir da oitava semana elevação na sua concentração, sendo que tal oscilação foi significativa segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$; Apêndice E). Tal comportamento também pode ter sido influenciado pela possível interferência ocorrida na determinação de clorofila.

Contudo, para as amostras em embalagem laminada, houve redução significativa da concentração de feofitina *a* e total ($p < 0,05$; Apêndice E) ao longo de todo o período de armazenagem.

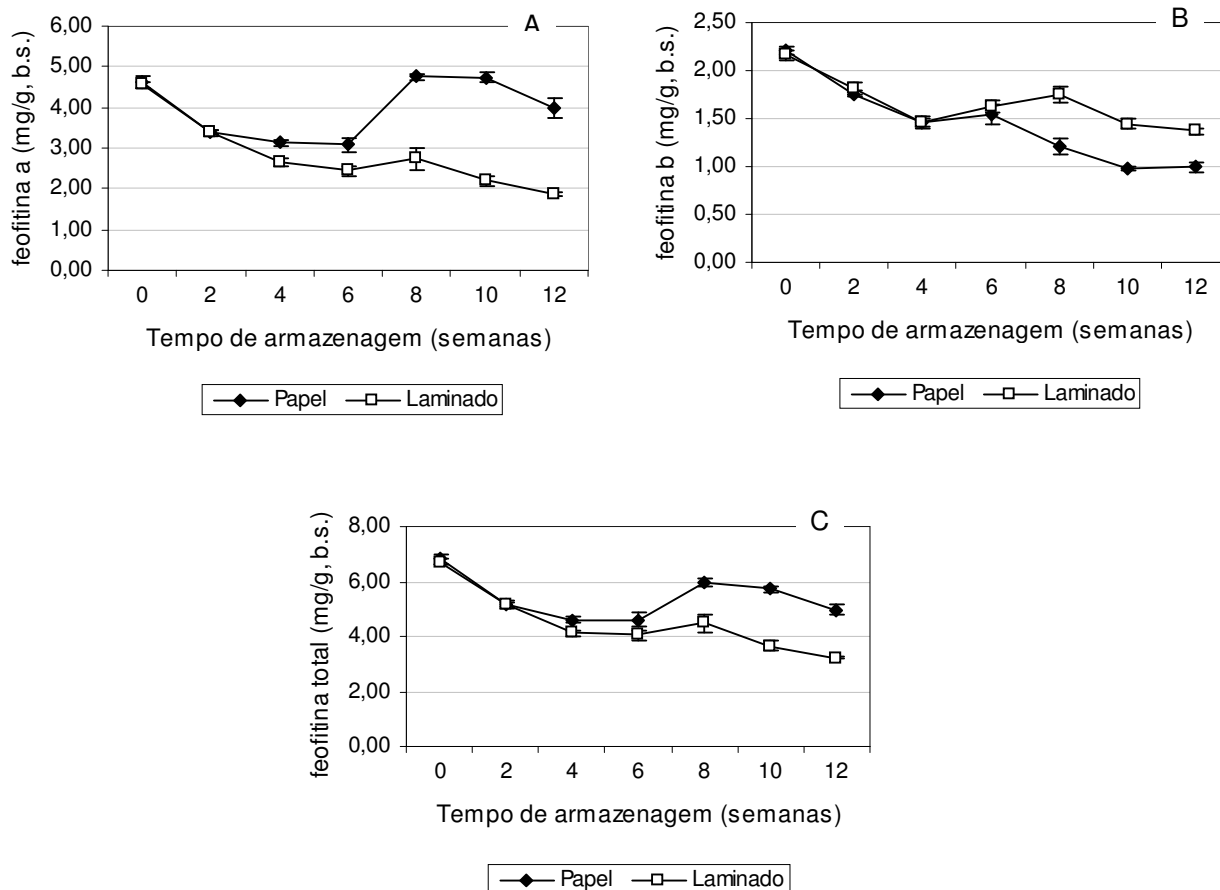


Figura 12 – Variação da concentração de feofitina a (A), feofitina b (B) e feofitina total (C) em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem. Os dados mostrados representam a média de três repetições \pm o desvio padrão.

Pode ser observado também na Figura 12A e 12C que do tempo zero até a segunda semana de armazenagem, a concentração da feofitina a e total não foi estatisticamente diferente entre as duas embalagens ($p > 0,05$). Porém a partir da quarta semana, o teste de Tukey confirma que a concentração da feofitina a e total foi significativamente maior para a embalagem de papel em relação à laminada ($p < 0,05$; Apêndice E).

A conversão de clorofila em feofitina é o mecanismo mais comum de degradação da clorofila, tendo em vista que o pH da maioria dos vegetais favorece esta reação, e o fato de que mesmo em valores de atividade de água muito baixos ela pode ocorrer (Lajolo & Lanfer-Marquez, 1982).

Portanto, era esperado aumento na concentração de feofitina desde o primeiro momento de análise a partir do tempo zero de armazenagem (duas

semanas), pois houve redução significativa ($p < 0,05$) da concentração de clorofila *a* e total no mesmo período (Apêndice D). Porém, houve redução significativa da feofitina *a* e total para as duas embalagens até a quarta semana ($p < 0,05$; Apêndice E).

Maharaj & Sankat (1996) também verificaram perda de clorofila sem formação de feofitina em folhas de inhame desidratadas. Foi sugerido que a clorofila tenha sido degradada por outros mecanismos, como oxidação (alomerização ou abertura do anel tetrapirrólico).

Não se descarta a possibilidade de ter ocorrido formação de feofitina desde o início, mas, se foi formada, a velocidade de degradação da feofitina foi maior que a velocidade de formação deste pigmento até a quarta semana. Somente após a oitava semana, para a embalagem de papel, feofitina *a* e total apresentaram aumento de concentração, o que sugere ter ocorrido maior feofitinação na erva-mate desta embalagem.

A degradação da clorofila em feofitina pode ser retardada quando o conteúdo de umidade do vegetal é reduzido ou a atividade de água é baixa (Schwartz & Lorenzo, 1990). Em produtos desidratados, como espinafre, Dutton et al (1943 apud Schwartz & Lorenzo, 1990) observaram que o conteúdo de feofitina diminuiu com o nível de umidade da amostra. A baixa atividade de água da amostra inicial e no interior da embalagem laminada provavelmente retardou a reação. Por outro lado, o ganho de umidade pela erva-mate na embalagem de papel provavelmente provocou o aumento da taxa de feofitinação nessas amostras.

Lajolo et al (1971) em estudo com espinafre desidratado concluíram que em atividade de água maior que 0,32 a feofitinação foi o principal mecanismo de degradação da clorofila. Porém, em atividade de água menor que 0,32, foi encontrada uma taxa muito baixa de feofitinação e observou-se a formação de outros compostos em adição à feofitina, os quais não puderam ser identificados, mas foi sugerido que fossem produtos de oxidação. O oxigênio e radicais livres presentes na erva-mate podem ter causado oxidação e conseqüentemente a degradação da feofitina, levando à formação de moléculas com características espectrais diferentes ou até mesmo incolores.

A feofitina *b* apresentou redução significativa para as duas embalagens ($p < 0,05$; Apêndice E) ao longo do período de armazenagem, o que provavelmente

ocorreu pelos mesmos motivos que ocasionaram redução na feofitina *a* e total. Com relação às embalagens, a concentração de feofitina *b* apresentou valores significativamente mais altos ($p < 0,05$) para a laminada que para a embalagem de papel a partir da oitava semana, o que foi um comportamento inesperado. Tanto a formação de feofitina *a* quanto de feofitina *b* são influenciados pelos mesmos fatores, entre eles a atividade de água e o pH (Fennema, 2000), de forma que a concentração de feofitina *b* deveria ter sido maior para a embalagem de papel que para a erva-mate em embalagem laminada. Possivelmente o cálculo da concentração da feofitina *b* também tenha sido afetado pela interferência de outros pigmentos produzidos durante a armazenagem.

4.3. Variação da cor medida instrumentalmente durante armazenagem da erva-mate em condições ambientais, nas embalagens papel e laminada

4.3.1. Luminosidade (L^*)

Os valores de L^* obtidos pela análise instrumental de cor são mostrados na Figura 13. A análise de variância identificou influência significativa ($p < 0,01$) da embalagem e do tempo sobre esta coordenada do espaço de cores CIELAB (Apêndice J).

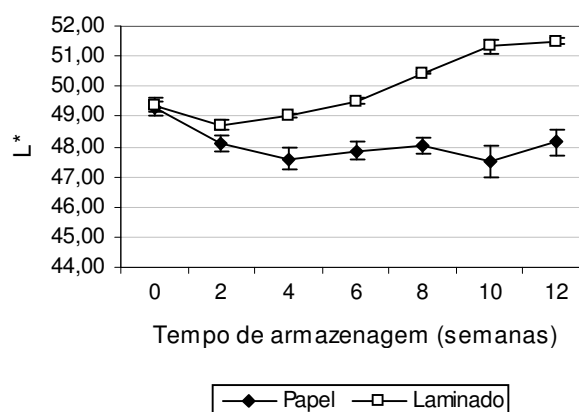


Figura 13 – Variação do parâmetro L^* em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem. Os dados mostrados representam a média de três repetições \pm o desvio padrão.

Através do teste de Tukey ($p < 0,05$), observa-se que L^* elevou-se lenta, porém significativamente nas amostras em embalagem laminada ao longo da

armazenagem, enquanto para a embalagem de papel houve uma pequena redução, também significativa, no início da armazenagem, mantendo-se constante no seu decorrer (Apêndice B). Dessa forma, desde a quarta semana de armazenagem o valor de L^* é significativamente maior para a embalagem laminada que para a de papel ($p < 0,05$; Apêndice B).

A luminosidade é uma coordenada do espaço de cores CIELAB que pode variar do 0 ao 100, ou seja, do preto ao branco (Lawless & Heymann, 1999). Sendo assim, pelos resultados obtidos deduz-se que a cor das amostras em embalagem laminada ficou mais clara e das amostras em embalagem de papel se tornou mais escura que a amostra no tempo zero.

Valduga (2005), analisando a vida-de-prateleira da erva-mate em diferentes embalagens, observou aumento significativo de L^* ao longo do tempo de armazenagem (120 dias), porém não verificou diferença significativa entre embalagem laminada e papel. Santos (2004) analisou a cor em erva-mate armazenada em condições ambientais em embalagens plásticas, e obteve influência significativa do tempo e da embalagem sobre o L^* , de forma que para as três embalagens o valor aumentou significativamente ao longo do tempo (180 dias). No estudo de Sinnecker et al (2002) com grãos de soja, L^* apresentou correlação negativa significativa com a concentração de clorofila total nos grãos armazenados a 25° C, o que significa que houve elevação do valor de L^* concomitante à perda de clorofila.

O escurecimento das amostras em embalagem de papel pode estar relacionado com a reação de escurecimento não-enzimático, hipótese levantada anteriormente na discussão de TBARS e dos pigmentos clorofílicos. Um decréscimo significativo do valor de L^* foi observado por Morales & Jiménez-Pérez (2001) durante a formação de pigmentos na reação de Maillard, os quais ocasionaram escurecimento do meio reativo.

4.3.2. Parâmetros de cor (a^* e b^*)

A variação dos parâmetros de cor a^* e b^* nas amostras de erva-mate nas diferentes embalagens ao longo da armazenagem é mostrada na Figura 14. Observa-se que os valores encontrados para o parâmetro a^* foram negativos (que

corresponde à cor verde) e do parâmetro b^* positivos (amarelo) em todas as análises realizadas.

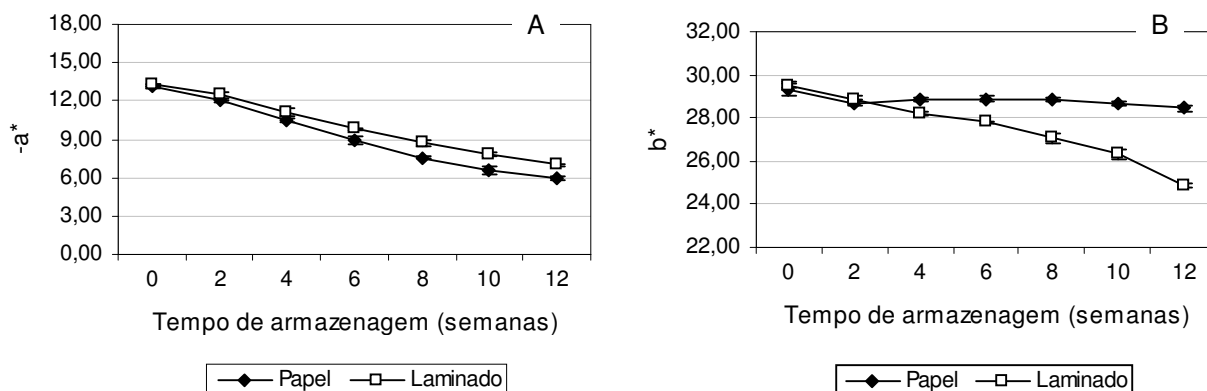


Figura 14 – Variação dos parâmetros de cromaticidade a^* (A) e b^* (B) em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem. Os dados mostrados representam a média de três repetições \pm o desvio padrão.

Pela análise de variância (Apêndices K e L), observou-se efeito significativo da embalagem e do tempo de armazenagem sobre os dois parâmetros de cor ($p < 0,01$). O efeito do tempo foi de redução, de forma que para as duas embalagens houve decréscimo significativo nos valores absolutos dos parâmetros a^* e b^* ao longo da armazenagem, porém com velocidades diferentes ($p < 0,05$; Apêndice B).

A comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) mostrou diferença significativa do valor de $-a^*$ entre as embalagens a partir da quarta semana de armazenagem, quando a erva-mate embalada em papel começou a mostrar valores mais baixos. Para valores negativos do parâmetro a^* , a aproximação do zero no espaço de cores corresponde à perda de cor verde (Lawless & Heymann, 1999), a qual foi verificada para as amostras das duas embalagens, porém em maior intensidade para a embalagem de papel.

A redução do valor de $-a^*$ já foi verificada em diversos estudos no processamento e na armazenagem da erva-mate (Schmalko & Alzamora, 2001; Santos, 2004; Schmalko et al, 2005; Valduga, 2005), a qual tem sido atribuída à perda de clorofila e/ou da cor verde brilhante. No trabalho de Valduga (2005) a embalagem de papel também apresentou maior redução ao longo do tempo em comparação à embalagem laminada. Outros autores também reportaram o mesmo

tipo de comportamento no valor de a^* , devido à feofitinação da clorofila (Steet & Tong, 1996; Weemaes et al, 1999; Koca et al, 2006).

Foi realizada análise de correlação sobre os dados obtidos com a erva-mate em embalagem laminada, cruzando a clorofila com o parâmetro de cor a^* . Houve correlação significativa ($p < 0,01$) com clorofila a ($r = 0,86$), b ($r = 0,83$) e total ($r = 0,87$). O parâmetro a^* tem mostrado correlação com a concentração de clorofila em diversos trabalhos (Schmalko & Alzamora, 2001; Sinnecker et al, 2002; Cabral-Malheiros et al, 2006).

O parâmetro b^* , nas amostras em embalagem de papel, mostrou redução significativa apenas entre o tempo zero e duas semanas de armazenagem, mantendo-se nos mesmos níveis no restante do período ($p < 0,05$; Apêndice B). Diferentemente, a erva-mate em embalagem laminada mostrou queda constante do valor de b^* durante todo o período de armazenagem ($p < 0,05$; Apêndice B). O decréscimo do valor positivo de b^* no espaço de cores indica perda de amarelo (Lawless & Heymann, 1999).

Nas amostras de Valduga (2005), o valor de b^* foi reduzido significativamente ao longo do período de armazenagem, mas sem diferença significativa entre as embalagens. Nessas amostras, apesar de não ter sido confirmada estatisticamente, foi percebida pelo gráfico uma redução maior de b^* para a embalagem laminada em relação à de papel. Já para Santos (2004), a coordenada b^* foi influenciada estatisticamente pela embalagem (o autor utilizou três tipos de embalagens plásticas diferentes) e também pelo tempo de armazenagem.

Estudando vagens congeladas, Martins & Silva (2002) verificaram que a coordenada b^* exibiu uma taxa de degradação mais rápida que a coordenada a^* . Para Weemaes et al (1999), estudando suco de brócolis, a feofitinação não afetou o valor de b^* , sugerindo que a variação deste parâmetro ocorra por outros mecanismos de degradação da clorofila ou por degradação de outros compostos presentes na amostra. No trabalho de Santos (2004) com erva-mate, os resultados obtidos para as três embalagens testadas demonstraram que a embalagem de polietileno tereftalato apresentou maior estabilidade para manutenção dos parâmetros de cor verde na erva-mate, entre eles o b^* , o que o autor justifica pelo fato de essa embalagem apresentar uma menor taxa de permeabilidade ao oxigênio.

A análise de correlação entre o parâmetro de cor b^* e os pigmentos clorofílicos, assim como ocorreu com o parâmetro a^* (considerando somente a

embalagem laminada), também apresentou correlação significativa de b^* com clorofila a , b e total ($r = 0,84$; $r = 0,82$ e $r = 0,85$, respectivamente).

O parâmetro b^* tem mostrado na literatura resultados conflitantes quanto a sua correlação com a concentração de clorofila. Em estudo sobre a armazenagem de erva-mate, Schmalko et al (2005) verificaram que a degradação da clorofila não influenciou o parâmetro b^* . Por outro lado, Schmalko & Alzamora (2001) obtiveram uma correlação negativa entre o valor b^* e o conteúdo de clorofila avaliando a alteração da cor durante o processamento da erva-mate. Já no estudo de Ihl et al (1998), o branqueamento de alcachofra por diferentes métodos resultou em redução de b^* , concomitante com a perda de clorofila.

A Figura 15 localiza no espaço de cores CIELAB os valores das coordenadas a^* e b^* obtidos durante o experimento, desconsiderando a luminosidade e mostrando apenas o quadrante de interesse do plano cartesiano.

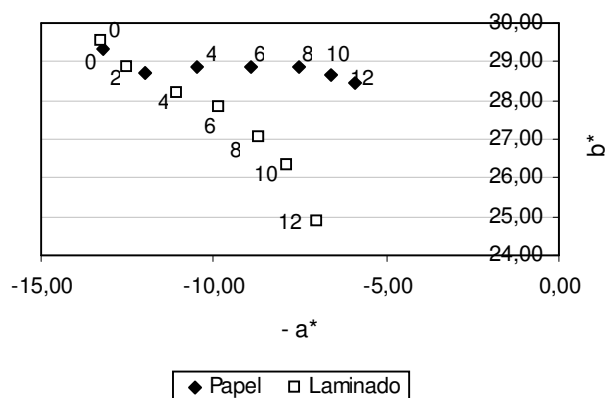


Figura 15 – Localização da cor no plano $-a^*$ versus b^* do espaço de cores CIELAB, a luminosidade constante. Os dados mostrados representam a média de três repetições. O rótulo dos dados significa o tempo de armazenagem em semanas.

Pode-se observar na Figura 15 a diferença no comportamento da cor ao longo da armazenagem nas amostras das diferentes embalagens. Percebe-se que para a embalagem de papel houve uma tendência predominante de aproximação do zero na coordenada a^* , de forma que a perda de verde somada à pequena perda de amarelo do eixo b^* resulta numa tonalidade verde menos intensa e torna o amarelo mais proeminente. Já para a embalagem laminada, observa-se queda acentuada no valor de b^* , além de diminuição do $-a^*$, ocorrendo ao mesmo tempo perda

expressiva de verde e de amarelo, o que resulta em uma cor menos intensa no verde e no amarelo, e por conseguinte menos amarelada que a erva-mate da embalagem de papel.

4.3.3. Diferença total de cor (ΔE^*)

A variação da diferença total de cor (ΔE^*) na erva-mate nas duas embalagens ao longo da armazenagem pode ser observada na Figura 16. A análise de variância indicou influência significativa ($p < 0,01$; Apêndice O) da embalagem e do tempo sobre o valor de ΔE^* , porém o teste de Tukey verificou que não houve diferença significativa entre as duas embalagens ($p < 0,05$). Desta maneira, houve um aumento progressivo da diferença total de cor durante a armazenagem da erva-mate, similar para as duas embalagens.

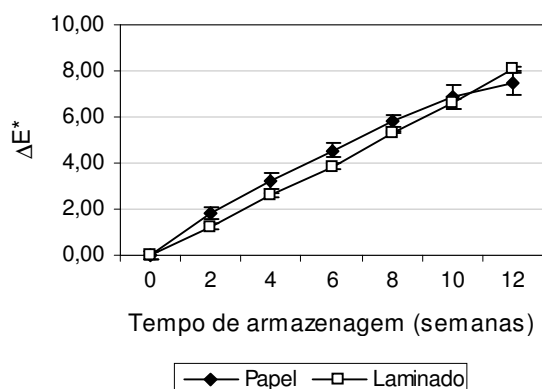


Figura 16 – Variação da diferença total de cor em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem. Os dados mostrados representam a média de três repetições \pm o desvio padrão.

O ΔE^* é uma função de cor calculada a partir dos valores de L^* , a^* e b^* tendo por base um valor de referência, e foi desenvolvida para se aproximar de uma diferença perceptível ao olho humano (Lawless & Heymann, 1999). Nesse experimento tomaram-se por referência os valores de L^* , a^* e b^* no tempo zero de armazenagem.

Embora a cor e a perda de clorofila sejam bem correlacionadas, para Martins & Silva (2002) em vagens congeladas não houve correspondência linear entre a diferença total de cor e as perdas de clorofila. Tal discrepância entre cor e concentração de clorofila é atribuída na maioria dos casos ao fato de que as

medidas de cor são quantitativamente diferentes da determinação da massa de clorofila, porém tem sido apontado que pode estar relacionada a diferentes mecanismos de degradação da clorofila entre os tratamentos dos experimentos (Venning et al, 1989 apud Martins & Silva, 2002).

Conforme a Tabela 2, a contribuição dos diferentes parâmetros sobre a diferença total de cor é bastante diferente entre as embalagens, principalmente para L^* e b^* . Isso sugere que, apesar de o valor numérico da diferença total de cor ter sido semelhante para as embalagens laminada e de papel, o mecanismo de alteração da cor e o resultado visual tenham sido bastante diferentes nas amostras de erva-mate das diferentes embalagens. Portanto, considera-se que ΔE^* não é adequado para a comparação entre as embalagens neste estudo, porém, dá uma idéia da extensão da alteração da cor ao longo do tempo durante a armazenagem da erva-mate.

Tabela 2 – Coeficientes de correlação e de determinação entre as coordenadas de cor $L^*a^*b^*$ e o ΔE^* , para os dois tipos de embalagem utilizadas.

Embalagem / coordenada		Coeficiente de correlação (r) / coeficiente de determinação (R^2) ¹		
		L^*	a^*	b^*
ΔE^*	Papel	-0.56 / 0,31	-0.99 / 0,98	-0.68 / 0,46
	Laminada	0.90 / 0,81	-0.99 / 0,98	-0.98 / 0,96

¹ nível de significância de 1%

4.3.4. Ângulo de matiz (h°)

O ângulo de matiz é a medida que mais se aproxima do que o ser humano refere-se como a cor de um objeto (Lawless & Heymann, 1999). Sua variação durante a armazenagem pode ser visualizada na Figura 17.

Note-se que os valores encontrados para o ângulo de matiz estão compreendidos entre 90° e 180° , sendo que o ângulo de 90° corresponde ao amarelo e o ângulo de 180° ao verde no espaço de cores CIELCH (Minolta, 1991).

Houve influência significativa do tempo e da embalagem sobre o ângulo de matiz ($p < 0,01$), conforme a análise de variância apresentada no Apêndice M. A Figura 17 mostra redução do valor do h° para as duas embalagens ao longo do tempo, porém uma redução mais acentuada para as amostras em embalagem de

papel. O teste de Tukey verificou que houve diferença significativa entre as duas embalagens a partir da quarta semana de armazenagem ($p < 0,05$; Apêndice C). A diminuição do ângulo no plano cartesiano resulta numa aproximação do amarelo e conseqüente distanciamento do verde. Por este raciocínio, constata-se que a erva-mate tornou-se menos verde e mais amarela com o decorrer da armazenagem, porém esta transformação foi mais intensa nas amostras em embalagem de papel.

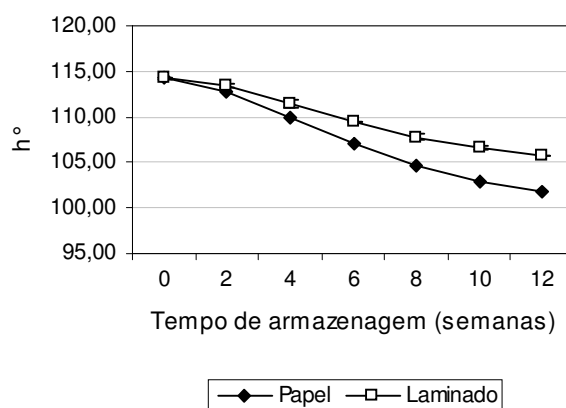


Figura 17 – Variação do ângulo de matiz em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem. Os dados mostrados representam a média de três repetições \pm o desvio padrão.

Situação semelhante ocorreu no trabalho de Valduga (2005), em que houve redução do ângulo de matiz, o qual foi influenciado significativamente pelo tempo de armazenagem e pela embalagem. Além do mais, observou-se que a erva-mate em embalagem de papel também apresentou valores de h° significativamente menores que para a laminada.

Para Berset & Caniaux (1983), o ângulo de matiz foi altamente correlacionado com o ranking visual e com o conteúdo de clorofila residual em folhas de salsa desidratada. Em virtude disso, os autores sugeriram que a função cromática ângulo de matiz possa ser usada para predizer a composição química de pigmentos ou a avaliação sensorial da cor em folhas de salsa desidratadas.

A correlação entre h° e a concentração de clorofila na embalagem laminada foi positiva, com $p < 0,01$ ($r = 0,85$; $r = 0,84$ e $r = 0,82$, respectivamente, para clorofila total, clorofila *a* e clorofila *b*). Os coeficientes de correlação são similares aos encontrados para as coordenadas de cor a^* e b^* .

Sweeney & Martin (1958 apud Weemaes et al 1999) sugeriram que a perda de cor verde deve-se principalmente à feofitinação da clorofila *a*, pois a clorofila *a*

tem uma cor descrita como verde-azulada intensa, enquanto a clorofila *b* é caracterizada como verde-amarelada (próxima do matiz da feofitina).

Houve correlação positiva de h° com a concentração de feofitina *a* das amostras em embalagem laminada ($r = 0,87$; $p < 0,01$), o que significa que uma redução da concentração de feofitina estaria relacionada à diminuição do ângulo de matiz (afastamento do verde e aproximação do amarelo). Todavia, a reação de feofitinação causa uma sensível mudança de cor, de um verde-brilhante para um verde-oliva (Schwartz & Lorenzo, 1990). Essa discrepância deve-se ao resultado inesperado da evolução da feofitina durante a armazenagem da erva-mate, a qual pode ser observada na Figura 12.

4.3.5. Croma (C^*)

Conforme se observa na Figura 18, o valor de croma diminuiu durante a armazenagem da erva-mate. Tanto o tempo quanto a embalagem influenciaram significativamente ($p < 0,01$; Apêndice N), mas somente a partir da sexta semana houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as duas embalagens utilizadas, o que foi verificado pelo teste de Tukey (Apêndice C).

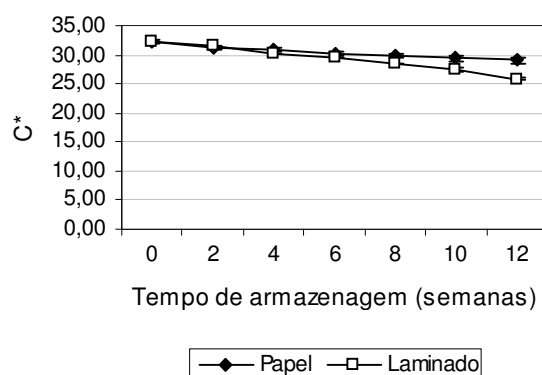


Figura 18 – Variação do croma em erva-mate em embalagem de papel e laminada em função do tempo de armazenagem. Os dados mostrados representam a média de três repetições \pm o desvio padrão.

O croma, ou índice de saturação, é uma função de cor do espaço de cores CIELCH, o qual faz menção da concentração da cor, de forma que, quanto mais afastado de zero, visualmente percebe-se maior “brilho” da cor.

Observou-se que o croma decaiu ao longo da armazenagem da erva-mate de forma significativa, sendo mais acentuado para a embalagem laminada. Esse resultado provavelmente levou a uma maior “palidez”, ou maior tendência ao cinza, para a erva-mate desta embalagem. Essa aproximação do cinza também pode ter ocorrido para as amostras em embalagem de papel, porém em menor extensão.

Não foram encontradas na literatura determinações de croma durante a armazenagem de erva-mate. Ihl et al (1998), estudando diferentes métodos de branqueamento em alcachofra (microondas, vapor e água fervente), verificaram que o tratamento que causou maior perda de pigmentos clorofílicos (vapor) também apresentou maior redução do croma.

4.4. Elucidação de possíveis mecanismos de degradação da clorofila e alteração da cor durante armazenagem da erva-mate em condições ambientais, nas embalagens papel e laminada

A clorofila é sensível ao pH, enzimas, oxidação, temperatura e luz, e a velocidade das reações é determinada pela atividade de água do alimento (Bohn & Walczyk, 2004). Nesse experimento não houve exposição das amostras à luz durante a armazenagem e a temperatura foi controlada, de forma que foram avaliados somente o efeito do pH, enzimas, oxidação e atividade de água.

Atividade peroxidásica não foi detectada durante todo o período de armazenagem para as amostras das duas embalagens. Atividade enzimática residual, devido a tratamento térmico inadequado, é uma das possíveis causas para perda de clorofila em alimentos processados (Martins & Silva, 2002). No entanto, tratamentos térmicos eficazes podem levar à perda de atividade enzimática, de forma que a degradação da clorofila passa a ser afetada somente por fatores ambientais (Heaton & Marangoni, 1996).

Portanto, dos fatores enumerados como possíveis causadores da degradação da clorofila, restou o efeito do pH, atividade de água e oxidação sobre a erva-mate. O pH ácido ocasiona a reação de feofitinação, sendo que a feofitina acarreta em coloração verde-oliva no vegetal, e a oxidação pode gerar diversos produtos de degradação da clorofila (incolores ou que absorvem em comprimentos de onda diferentes da clorofila). Diferentes níveis de atividade de água favorecem a feofitinação ou a oxidação, aumentando ou diminuindo a velocidade dessas

reações, determinando qual delas seja predominante em determinada amostra (Fennema, 2000).

Como foi comentado anteriormente, a quantificação dos pigmentos clorofílicos provavelmente sofreu interferências de outros pigmentos. Em virtude disso, para verificar os possíveis mecanismos de degradação da clorofila e alteração da cor, optou-se por fazer um estudo da correlação entre os parâmetros de cor e os agentes de degradação da clorofila, ao invés de correlacionar estes com a concentração de pigmentos. Diversos autores têm discutido a vantagem das medições objetivas de cor em relação às análises químicas de pigmentos (Francis, 1995; Martins & Silva, 2002).

A determinação da concentração de pigmentos pode indicar a extensão de uma alteração de cor durante armazenagem, mas não leva em conta o estado físico dos produtos, especialmente caso ocorram colorações adicionais durante o tratamento. Além disso, a extração e a análise de pigmentos freqüentemente apresentam dificuldades. Ao contrário, as técnicas de medição de cor instrumental são de fácil manuseio e são utilizados na pesquisa na área de alimentos com o objetivo de obter medições objetivas da cor (Berset & Caniaux, 1983).

A Tabela 3 apresenta o estudo de correlação onde foram cruzados os valores das coordenadas de cor L^* , a^* e b^* e as funções de cor h° , C^* e ΔE^* com os valores de atividade de água, pH e TBARS obtidas para as duas embalagens durante os sete períodos de armazenagem.

Tabela 3 – Coeficientes de correlação entre atividade de água, pH e TBARS e as coordenadas de cor L^* , a^* e b^* e as funções de cor h° , C^* e ΔE^* para os dois tipos de embalagem e os sete períodos de armazenagem.

	L^*	$(-)a^*$	b^*	h°	C^*	ΔE^*
atividade de água	-0.75 ($p < 0.01$)	0.49 ($p < 0.01$)	0.32 ($p < 0.05$)	-0.58 ($p < 0.01$)	0.00 ($p > 0.05$)	0.39 ($p < 0.05$)
pH	0.42 ($p < 0.01$)	0.78 ($p < 0.01$)	0.83 ($p < 0.05$)	0.83 ($p < 0.01$)	0.36 ($p < 0.05$)	-0.70 ($p < 0.01$)
TBARS	0.79 ($p < 0.01$)	-0.61 ($p < 0.01$)	-0.92 ($p < 0.01$)	-0.50 ($p < 0.01$)	-0.91 ($p < 0.01$)	0.72 ($p < 0.01$)

Na embalagem de papel, as principais alterações na cor da erva-mate foram mudança de matiz, do verde inicial para um verde mais amarelado, menor luminosidade (escurecimento) e perda do brilho da cor (redução do croma), de verde brilhante para verde mais acinzentado. Na embalagem laminada, as principais alterações na cor foram alteração do matiz, do verde inicial para um verde mais amarelado, aumento na luminosidade (clareamento), e perda do brilho da cor, de verde brilhante para verde mais acinzentado. Note-se que a alteração do matiz foi mais acentuada na erva-mate em embalagem de papel que em embalagem laminada, enquanto a perda de brilho foi mais intensa para a embalagem laminada.

Na Tabela 3 observa-se uma maior correlação de h° com pH do que com atividade de água e TBARS, o que relaciona a diminuição de h° com a acidificação do pH do produto. Isso sugere que o h° tenha diminuído (se aproximado do amarelo no espaço de cores) primordialmente por reação de feofitinação. O parâmetro de cor a^* também teve boa correlação com o pH (Tabela 3), o que o associa também com a feofitinação. Dessa forma, teria ocorrido feofitinação nas duas embalagens, por ter havido redução significativa de h° e a^* ao longo da armazenagem em todas as amostras (teste de Tukey com $p < 0,05$; Apêndices C e B). Contudo, a provável feofitinação foi mais pronunciada na embalagem de papel, devido aos valores de pH, h° e a^* terem reduzido significativamente mais nessa embalagem ao longo do tempo ($p < 0,05$; Apêndices A, C e B).

O pH dos vegetais é resultado dos ácidos provenientes do conteúdo vacuolar das células (Fennema, 2000). Segundo Tijskens et al (2001), quanto mais ácido (menor) o pH do meio, mais rápida é a descoloração de vegetais clorofilados. Como as taxas da reação de feofitinação são geralmente maiores que de outras rotas de degradação da clorofila, considera-se que esse é o mais importante mecanismo de destruição da clorofila durante o processamento de alimentos (Martins & Silva, 2002).

A análise estatística também evidenciou que houve correlação entre atividade de água e pH ($r = -0,83$; $p < 0,01$), o que indica que o aumento da atividade de água contribuiu com a redução do pH nas amostras. Isso é coerente com o fato de que a correlação negativa entre atividade de água e h° foi significativa ($p < 0,01$; Tabela 3). Segundo Schwartz & Lorenzo (1990), a perda de clorofila por feofitinação pode ser retardada quando o conteúdo de umidade dos vegetais ou a atividade de água são reduzidos.

Schmalko et al (2005) verificaram dependência da atividade de água na taxa de degradação da clorofila, em especial da clorofila *a*, durante armazenagem de erva-mate. Foi evidenciado que a velocidade da degradação aumentava com o aumento da atividade de água, desde que esta fosse maior que 0,30.

A alta correlação entre o parâmetro de cor b^* e o nível de TBARS (Tabela 3) supõe que a redução de b^* tenha sido causada primordialmente por reações de oxidação. Os resultados obtidos por Santos (2004) em erva-mate corroboram com esta hipótese, pois houve diminuição maior de b^* nas amostras que tiveram maior disponibilidade de oxigênio. Dessa forma, pode-se dizer que na embalagem laminada o provável efeito da oxidação sobre b^* teve maior importância que na de papel, pois as amostras desta embalagem apresentaram estatisticamente maior redução de b^* e elevação de TBARS, em relação à de papel ($p < 0,05$; Apêndices B e A). Somando-se a isso, sugere-se que tenha sido a oxidação o motivo da redução inesperada da concentração de feofitina no começo da armazenagem nas duas embalagens, o que teria ocasionado a redução de b^* nas amostras (Figura 12).

Conforme a Tabela 3, houve também correlação significativa de b^* , porém menor ($p < 0,05$), com o pH. Todavia, considerando-se a conclusão de Weemaes et al (1999) de que a feofitinação em suco de brócolis não afetou o valor de b^* , é reforçada a hipótese de que a oxidação primordialmente tenha influenciado b^* nas amostras de erva-mate. Além do mais, no espaço de cores CIELAB, a redução de b^* significa afastamento do amarelo, de forma que se a feofitinação sabidamente leva ao amarelamento do produto (Fenemma, 2000), não seria lógico uma redução de b^* (diminuição do amarelo).

A luminosidade (L^*) apresentou coeficientes de correlação próximos para atividade de água e TBARS, conforme a Tabela 3. Note-se que não houve correlação significativa entre atividade de água e TBARS ($p > 0,05$), o que concorda com a suposição de que a elevação ou a redução de L^* , em amostras diferentes, tenha ocorrido por causas distintas. A relação entre luminosidade e atividade de água é inversamente proporcional, de forma que aumentando a atividade de água ocorreu concomitantemente redução de L^* . Este fato confere com a hipótese de desenvolvimento da reação de Maillard na erva-mate em embalagem de papel, onde houve ganho significativo de umidade e conseqüente aumento da atividade de água, o que teria levado ao escurecimento da amostra.

Por outro lado, a relação entre luminosidade e TBARS, dada pela Tabela 3, é coerente com o aumento de L^* na embalagem laminada, a qual também apresentou níveis de oxidação lipídica significativamente maiores ($p < 0,05$; Apêndice A). Isto sugere que o clareamento da amostra pode ter ocorrido pela oxidação de pigmentos.

Conforme a Tabela 3, houve uma correlação muito alta entre C^* e TBARS, já entre C^* e pH a correlação, apesar de significativa ($p < 0,05$), foi muito baixa. Pode-se a partir disto relacionar a perda do brilho da cor com a oxidação lipídica, a qual possivelmente ocasionou a oxidação de pigmentos clorofílicos. Segundo Lajolo et al (1971), compostos sem o característico espectro de absorção da clorofila podem ser formados sob a ação da peroxidação lipídica, os quais podem ser incolores. Isto confere com a diferença observada entre as embalagens usadas no experimento, pois a perda de brilho (redução do C^*) e o nível de oxidação lipídica foram significativamente maiores ($p < 0,05$) para a embalagem laminada que para a de papel (Apêndices C e A).

Recentes estudos sobre a armazenagem da erva-mate tipo chimarrão chamam a atenção para a importância da oxidação na alteração da sua cor. Santos (2004) verificou que a oxidação determinou diferentes níveis de alteração de cor em erva-mate durante armazenagem em três tipos de embalagens plásticas. Não houve diferença significativa entre as embalagens na atividade de água das amostras, porém havia diferença na disponibilidade de oxigênio ao produto. As amostras com maior contato com oxigênio foram as mais alteradas na sua cor, bem como na concentração de clorofila. O estudo de Sordi et al (2003), avaliando o efeito do tipo de atmosfera, da pressão interna inicial e do tempo de armazenagem na cor da erva-mate (tipo chimarrão), constatou que quanto maior for o nível de vácuo, menor é a degradação da cor na erva-mate.

O ΔE^* correlacionou-se significativamente ($p < 0,01$) com pH e com TBARS, apresentando coeficientes de correlação muito próximos (Tabela 3). Isto corrobora com o fato de que a alteração total da cor nas amostras de erva-mate deveu-se tanto à feofitinação quanto à oxidação, porém em contribuições diferentes entre as embalagens.

5. CONCLUSÃO

Após 12 semanas de armazenagem da erva-mate tipo chimarrão em condições ambientais, nas embalagens laminada e de papel, conclui-se que:

A) Em relação à evolução da umidade, atividade de água, pH, oxidação lipídica e atividade enzimática na erva-mate armazenada:

- Não foi detectada atividade residual da peroxidase na erva-mate, o que descartou a possibilidade de atividade enzimática durante a armazenagem;
- Houve absorção de umidade e conseqüente aumento da atividade de água ao longo do tempo para a embalagem de papel, enquanto para a embalagem laminada houve aumento significativo da atividade de água apesar de não ter ocorrido absorção significativa de umidade;
- Houve redução do pH para as duas embalagens ao longo da armazenagem, sendo esta mais acentuada para a embalagem de papel;
- Ocorreu aumento significativo da oxidação lipídica para as duas embalagens, especialmente para a laminada.

B) Com relação aos pigmentos clorofílicos:

- Houve degradação da clorofila *a* e *b*, fato este confirmado pelos resultados de cor;
- Não foi possível concluir sobre a influência individual das duas formas da clorofila, *a* e *b*, na alteração da cor;
- Não foi possível concluir sobre a evolução da feofitina e sua influência na alteração da cor;
- Possivelmente foram formados produtos do escurecimento não enzimático na embalagem de papel, os quais podem ter interferido na determinação dos pigmentos clorofílicos.

C) Quanto à análise instrumental de cor (sistemas CIELAB e CIELCH):

- Na embalagem de papel, as principais alterações na cor foram redução de h° (do verde inicial para um verde mais amarelado), redução de L^* (escurecimento) e redução de C^* (perda do brilho da cor, de verde brilhante para verde mais opaco);

- Na embalagem laminada, as principais alterações na cor foram redução de h° (do verde inicial para um verde mais amarelado), aumento de L^* (clareamento), e redução de C^* (perda do brilho da cor, de verde brilhante para verde mais opaco);
- A alteração do matiz (h°) foi mais acentuada na erva-mate em embalagem de papel que em embalagem laminada, enquanto a perda de brilho (C^*) foi mais intensa para a embalagem laminada.
- Quanto às coordenadas a^* e b^* , na embalagem de papel houve redução de $-a^*$ (diminuição do verde) e redução de b^* (diminuição do amarelo), resultando num verde menos intenso e com o amarelo mais proeminente que a amostra inicial;
- Para a embalagem laminada, houve redução no valor de $-a^*$ e queda acentuada do b^* (perda de verde e perda de amarelo, respectivamente), o que resulta em um verde menos intenso e mais amarelado que o inicial, porém menos amarelado que a erva-mate da embalagem de papel.

D) Elucidando possíveis mecanismos de alteração de cor e degradação da clorofila durante a armazenagem, sugere-se que:

- A redução do h° e de a^* tenha ocorrido primordialmente por reação de feofitinação, ocasionando alteração do verde inicial para um verde mais amarelado;
- O aumento da atividade de água tenha contribuído com a redução do pH, favorecendo a feofitinação, e, portanto, a alteração do h° e de a^* ;
- A redução de b^* tenha sido causada basicamente por reações de oxidação, levando a uma perda de amarelo;
- Oxidação tenha ocasionado a redução de b^* e diminuição da feofitina nas primeiras semanas de armazenagem;
- A luminosidade (L^*) tenha sido influenciada pela atividade de água e pela oxidação, de forma que o aumento da atividade de água tenha levado à redução (escurecimento) e a oxidação tenha causado o seu aumento (clareamento);

- Escurecimento não-enzimático tenha participado na alteração da cor (escurecimento), o que teria ocorrido pela elevação da atividade de água;
- A oxidação lipídica tenha ocasionado a oxidação de pigmentos clorofílicos, levando à redução do C* (perda de saturação ou brilho da cor);
- A variação total de cor tenha sido influenciada tanto por oxidação quanto por feofitinização;
- As reações de degradação da clorofila predominantes tenham sido feofitinização na embalagem de papel e feofitinização e oxidação na embalagem laminada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARGÜELLO, B. Del V.; SPIONI, G.P.; MARTOS, M.S. Determinación de actividad peroxidasa en yerba mate (*Ilex paraguarienses*). **Información Tecnológica**, v.1, n.6, 1999.

ANUÁRIO Brasileiro da erva-mate. Santa Cruz do Sul: Gazeta Grupo de Comunicações, 1999.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos**: teoria e pratica. Viçosa: Imprensa Universitária, 1997.

BAHÇEÇI, K.S.;SERPEN, A.; GÖKMEN, V.; ACAR, J. Study of lipoxygenase and peroxidase as indicator enzymes in green beans: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 187–192, 2005.

BARBOSA-CABOVAS, G.V.; VEJA-MERCADO, H. **Dehydration of foods**. New York: Chapman & Hall, 1996.

BERSET, C.; CANIAUX, P. Relationship between color evaluation and chlorophyllian pigment content in dried parsley leaves. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 1854-1857, 1983.

BÍBLIA. 2000. **Bíblia Sagrada, Nova Versão Internacional**. São Paulo: Vida, 2000.

BOHN, T.; WALCZYK, T. Determination of chlorophyll in plant samples by liquid chromatography using zinc-phthalocyanine as an internal standard. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, p. 123-128, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC n.º 277 de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, 23 set. 2005.

CABRAL-MALHEIROS, G.; PARODI, T.V.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.R. Comparação de métodos espectrofotométricos para determinação de clorofila e feofitina em erva-mate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20., 2006, Curitiba. **Anais...** SBCTA, 2006. 1 CD-ROM.

CAMPOS, A. M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (erva - mate)**. 1996. 149p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

CANJURA, F.L.; SCHWARTZ, S.J.; NUNES, R.V. Degradation kinetics of chlorophylls and chlorophyllides. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 6, p. 1639-1643, 1991.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Curitiba: EMBRAPA/CNPFFlorestas, 1994.

CENI, G.C. **Oxidases de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.): extração, estabilidade térmica e influência da exposição ao microondas**. 2005. 174p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2005.

CHEFTEL, J.C.; CHEFTEL, H. **Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1992. 1 v.

CLYDESDALE, F.M. Color as a factor in food choice. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 83-101, 1993.

COSTA, S.G. **A erva-mate**. Curitiba: UFPR, 1989.

COULTATE, T.P. **Manual de química y bioquímica de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1998.

CRUZ, R.M.S.; VIEIRA, M.C.; SILVA, C.L.M. Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium officinale*). **Journal of Food Engineering**, v. 72, p. 8-15, 2006.

EGERT, M.; TEVINI, M. Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). **Environmental and Experimental Botany**, v. 48, p. 43-49, 2002.

ESMELINDRO, M.C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva-mate: influencia das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 193-204, maio/ago. 2002.

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

FILIP, R.; LÓTITO, S.B.; FERRARO, G.; FRAGA, C.G.; Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.

FRANCIS, F.J. Quality as influenced by color. **Food Quality and Preference**, v. 6, p. 149-155, 1995.

GALEANO, C.; BARRIONUEVO, M.R.E.; ARGÜELLO, B. Métodos alternativos de procesamiento para sapear hojas de yerba mate, tendientes a mantener el color y las clorofilas. In: CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE,

4., 2006, Posadas, Argentina. **Anais...** Posadas: Organizadores, 2006. 1 CD-ROM.

GANDUL-ROJAS, B.; ROCA, M.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I. Chlorophyll and carotenoid degradation mediated by thylakoid-associated peroxidative activity in olives (*Olea europaea*) cv. Hojiblanca. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 499–507, 2004.

GÖKMEN, V.; BAHÇEÇI, K.S.; SERPEN, A.; ACAR, J. Study of lipoxygenase and peroxidase as blanching indicator enzymes in peas: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. **LWT**, v. 38, p. 903–908, 2005.

GUGLIUCCI A, STAHL AJ. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry & Molecular Biology International**, v. 35, p. 47-56, 1995.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effect of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of Human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, p. 338-344, 1996.

GÜNES, B.; BAYINDIRLI, A. Peroxidase and lipoxygenase inactivation during blanching of green beans, green peas and carrots. **LWT**, v. 26, p. 406-410, 1993.

HEATON, J.W.; MARANGONI, A.G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends in Food Science and Technology**, v. 7, p. 8-15, jan. 1996.

HUNTERLAB. CIE L*a*b* color scale. **Applications note**, v. 8, n. 7, July 1-15, 1996. Disponível em: <<http://www.hunterlab.com>>. Acesso em: 02 dez. 2006.

HUNTERLAB. **The basics of color perception and measurement**. Version 1.4, 2001. Disponível em: <<http://www.hunterlab.com>>. Acesso em: 02 dez. 2006.

HYVÄRINEN, K.; HINNYNEN, P.H. Liquid chromatographic separation and mass spectrometric identification of chlorophyll b allomers. **Journal of Chromatography A**, v. 837, p. 107–116, 1999.

IHL, M; MONSALVES, M.; BIFANI, V. Chlorophyllase inactivation as a measure of blanching efficacy and colour retention of artichokes (*Cynara scolymus* L.). **LWT**, v. 31, p. 50-56, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**. Rio de Janeiro, v. 20, p. 1-50, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físicos e químicos para alimentos**. 3. ed. São Paulo, 1985. 1 v.

JAYARAMAN, K.S.; DAS GUPTA, D.K. Drying of fruits and vegetables. In: MUJUMDAR, A.S. **Handbook of industrial drying**, v. 1. New York: Marcel Dekker, 1995.

KÄNZIG, R.G. Control de calidad. In: WINGE, H. (Org.). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: UFRGS, p. 257-259, 1995.

KING, V.A.E.; LIU, C.F.; LIU, Y.J. Chlorophyll stability in spinach dehydrated by freeze-drying and controlled low-temperature vacuum dehydration. **Food Research Internacional**, v. 34, p. 167-175, 2001.

KOCA, N.; KARADENIZ, F.; BURDURLU, H.S. Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. **Food Chemistry**, v. 100, p. 609-615, 2006.

LAJOLO, F.M.; TANNENBAUM, S.R.; LABUZA, T.P. Reaction at limited water concentration. 2. Chlorophyll degradation. **Journal of Food Science**, v. 36, p. 850-853, 1971.

LAJOLO, F.M.; LANFER MARQUEZ, U.M. Chlorophyll degradation in a spinach system at low and intermediate water activities. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 1995-1998, 1982.

LANG, R.M. **Ocorrência de fungos toxigênicos e micotoxinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *paraguariensis*) comercializada em Santa Catarina**. 2005. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food**. Maryland: Aspen Publishers, 1999.

LEHNINGER, A.L. **Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1976. 2 v.

LEHNINGER, A.L.; NELSON D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LÓPEZ-AYERRA, B.; MURCIA, M.A.; GARCIA-CARMONA, F. Lipid peroxidation and chlorophyll levels in spinach during refrigerated storage and after industrial processing. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1/2, p. 113-118, 1998.

MAHARAJ, V.; SANKAT, C.K. Quality changes in dehydrated dasheen leaves: effects of blanching pre-treatments and drying conditions. **Food Research Internacional**, v. 29, n. 5-6, p. 563-568, 1996.

MAN, C.M.D.; JONES, A.A. **Shelf life evaluation of foods**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999.

MARTINS, R.C.; SILVA, C.L.M. Modelling colour and chlorophyll losses of frozen green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). **International Journal of Refrigeration**, v. 25, p. 966-974, 2002.

MATILE, P. Biochemistry of Indian summer: physiology of autumnal leaf coloration. **Experimental Gerontology**, v. 35, p. 145–158, 2000.

MATILE, P.; HÖRTENSTEINER, S.; THOMAS, H. Chlorophyll degradation. **Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 67–95, 1999.

MAZZA, A.; SCHMALKO, M.E. Variación de las isotermas de adsorción de la yerba mate durante el estacionamiento. In: CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4., 2006, Posadas, Argentina. **Anais...** Posadas: Organizadores, 2006. 1 CD-ROM.

MENDES, R.M.O. **Caracterização e avaliação da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), beneficiada no estado de Santa Catarina**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I.; GANDUL-ROJAS, B. High-performance liquid chromatographic study of alkaline treatment of chlorophyll. **Journal of Chromatography A**, v. 690, p. 161-176, 1995.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I.; GANDUL-ROJAS, B.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J. Preparation of Cu(II) complexes of oxidized chlorophylls and their determination by thin-layer and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 731, p. 261-271, 1996.

MINOLTA. **Chroma meter CR-300/CR-310/CR-321/CR-331/CR-331C Instruction manual**. Osaka (Japan), 1991.

MORALES, F.J.; JIMÉNEZ-PÉREZ, S. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. **Food Chemistry**, v. 72, p. 119-125, 2001.

MORAN, R. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N-dimethylformamide. **Plant Physiology**, v. 69, p. 1376-1381, 1982.

MORAWICKI, R.O.; SCHMALKO, M.E.; KANZIG, R.G. Chlorophyll stability in yerba maté leaves in controlled atmospheres. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 42, n. 1, p. 85-90, 1999.

NEGI, P.S.; ROY, S.K. Effect of drying conditions on quality of green leaves during long term storage. **Food Research International**, v. 34, p. 283-287, 2001.

NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. **Fundamentos de físico-química**. São Paulo: Artmed, 2002.

NIETSCHKE, K. et al. Análise sensorial de chimarrão pelo método de estimativa de magnitude. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA MATE, 2., 2000, Encantado-RS. **Anais...** Encantado: Organizadores, 2000. p. 169-170.

NOLLET, L.M.L. **Handbook of food analysis**. New York: Marcel Dekker, 1996. 1 v.

OSAWA, C.C.; FELÍCIO, P.E.; GONÇALVES, L.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

PARANÁ. Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate do. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba, 2000. Série PADCT III, n. 1.

PASINATO, R. **Aspectos etnoentomológicos, socioeconômicos e ecológicos relacionados à cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no município de Salto do Lontra, Paraná, Brasil**. 2004. 112p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

PENTEADO, S.R.C. Principais pragas da erva-mate e medidas alternativas para o seu controle. In: WINGER, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E.A.; TARASCONI, L.C. **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: UFRGS, p. 109-120, 1995.

RAMALLO, L.A.; ALBANI, O.A. Prediction and determination of water uptake in packaged yerba mate. **Food Science and Technology International**, v. 10, n. 1, p. 35-40, 2004.

RIO GRANDE DO SUL. Lei nº 11.929, de 20 de junho de 2003. Lei do churrasco e chimarrão. Institui o churrasco como “prato típico” e o chimarrão como “bebida símbolo” do Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, RS, 23 jun. 2003.

ROCA, M.; JAMES, C.; PRUZINSKÁ, A.; HORTENSTEINER, S.; THOMAS, H.; OUGHAM, H. Analysis of the chlorophyll catabolism pathway in leaves of an introgression senescence mutant of *Lolium temulentum*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1231–1238, 2004.

ROCKLAND, L.B.; BEUCHAT, L.R. **Water activity: theory and applications to food**. New York: Marcel Dekker, 1987.

ROTTA, E.; OLIVEIRA, Y.M.M. **Sistemas de produção**. Cultivo da erva-mate. In: EMBRAPA Florestas, 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Erva-mate/CultivodaErvaMate/02_distrib_geografica.htm>. Acesso em: 27 nov. 2006.

RUCKER, N.G.A. A cor no controle de qualidade em erva-mate. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2., 2000, Encantado. **Anais...** Encantado: Organizadores, 2000. p. 97-98.

RUCKER, N.G.A.; MACARI JR., A.; ROCHA JR., W.F. **Agronegócio da erva-mate no estado do Paraná: diagnóstico e perspectivas para 2003**. In: SECRETARIA da Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná. Disponível em: <<http://www.pr.gov.br/colepar/seab>>. Acesso em: 10 nov. 2005.

SABBATELLA, P.O.; BRUMOVSKY, L.A.; ACUÑA1, G.; SMORZSEWSKI, M. Variación de sólidos solubles de la yerba mate durante el desarrollo de una mateada. CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4., 2006, Posadas, Argentina. **Anais...** Posadas, Argentina: Organizadores, 2006. 1 CD-ROM.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4. ed. Belmont: Wadsworth, 1991.

SANTOS, K. A. Estabilidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) em embalagens plásticas. 2004. 109f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DA VILA, V.; BUSCHIAZZO, P.M.; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of an aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 357–360, 2000.

SCHMALKO, M.E; ALZAMORA, S.M. Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during yerba-mate processing. **Drying Technology**, v. 3, n. 19, p. 597-608, 2001.

SCHMALKO, M.E.; SCIPIONI, P.G.; FERREYRA, D.J. Effect of water activity and temperature in color and chlorophylls changes in yerba mate leaves. **International Journal of Food Properties**, v. 8, p. 313-322, 2005.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products: properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, p. 361-371, 2002.

SCHWARTZ, S.J.; LORENZO, T.V. Chlorophylls in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 1-17, 1990.

SINNECKER, P.; GOMES, M.S.O.; ARÊAS, J.A.G; LANFER-MARQUEZ, U.M. Relationship between color (instrumental and visual) and chlorophyll contents in soybean seeds during ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3961-3966, 2002.

SORDI, M.S.; JAVORNIK, G.; MOSSELE, S.; REZENDE, D.F.; VALDUGA, E. Efeitos da atmosfera modificada e do tempo de armazenamento nas características de cor e sabor da erva-mate (chimarrão). In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3., 2003, Chapecó-SC. **Anais...** Chapecó: Organizadores, 2003, p. 1-8.

ŠPUNDOVÁ, M.; POPELKOVÁ, H.; ILÍK, P.; SKOTNICA, J.; NOVOTNÝ, R.; NAUŠ, J. Ultra-structural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescing under dark and light conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 1051–1058, 2003.

STEET, J.A.; TONG, C.H. Degradation kinetics of green color and chlorophylls in peas by colorimetry and HPLC. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 5, p. 924-931, 1996.

SUZUKI, Y.; TANABE, K.; SHIOI, Y. Determination of chemical oxidation products of chlorophyll and porphyrin by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 839, p. 85-91, 1999.

TIJSKENS, L.M.M.; BARRINGER, S.A.; BIEKMAN, E.S.A. Modelling the effect of pH on the colour degradation of blanched broccoli. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 2, p. 315-322, 2001.

VALDUGA, E. et al. Nota prévia – Avaliação das características de qualidade da erva-mate (chimarrão) acondicionada em diferentes embalagens. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 2, p. 99-105, abr./jun. 2005.

VALDUGA, E. **Caracterização química e anatômica da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate**. 1995. 97f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

VALDUGA, A.T.; FINZER, J.R.D.; MOSELE, S.H. **Processamento de erva-mate**. Erechim: Edifapes, 2003.

WEEMAES, C.A.; OOMS, V.; VAN LOEY, A.M.; HENDRICKX. Kinetics of chlorophyll degradation and color loss in heated broccoli juice. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 2404-2409, 1999.

WONG, D.W.S. **Química de los alimentos: mecanismos y teoría**. Zaragoza: Acribia, 1989.

YAMAUCHI, N.; HARADA, K.; WATADA, A.E. In vitro chlorophyll degradation in stored broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) florets. **Postharvest Biology and Technology**, v. 12, p. 239-245, 1997.

XANDER, C.G.; ACOSTA, L.M.; SCIPIONI, G.P.; ARGÜELLO, B. DEL V. Inativación térmica de peroxidasas en *Ilex paraguariensis* St. Hill. y *dumosa*. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA-MATE, 2., 2000, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Organizadores, 2000.

ZAMPIER, A.C. **Avaliação dos níveis de nutrientes, cafeína e taninos após adubação mineral e orgânica, e sua relação com a produtividade na erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hil.)**. 2001. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

ZIELNIK, A. Keeping up appearances. **Journal of Architectural Coatings**. p. 63-67, Feb/Mar 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise estatística do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre umidade, atividade de água, TBARS e pH. Teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Semanas	Umidade (%)		Atividade de água		TBARS (nmol/g, b.s.)		pH	
	papel	laminado	papel	laminado	papel	laminado	papel	laminado
0	4,82 ± 0,16 ^d	4,84 ± 0,10 ^d	0,41 ± 0,01 ^{e,f}	0,39 ± 0,003 ^f	130,55 ± 3,11 ^d	126,67 ± 4,62 ^d	5,87 ± 0,03 ^{a,b}	5,90 ± 0,01 ^a
2	7,48 ± 0,14 ^c	4,90 ± 0,11 ^d	0,62 ± 0,01 ^d	0,41 ± 0,004 ^{e,f}	130,85 ± 3,82 ^d	132,19 ± 3,09 ^d	5,83 ± 0,01 ^{b,c,d}	5,87 ± 0,01 ^{a,b}
4	10,31 ± 0,66 ^b	4,95 ± 0,09 ^d	0,71 ± 0,02 ^{b,c}	0,40 ± 0,004 ^{e,f}	122,99 ± 4,38 ^d	132,95 ± 6,25 ^d	5,77 ± 0,01 ^{e,f}	5,85 ± 0,02 ^{a,b,c}
6	10,36 ± 0,44 ^b	4,80 ± 0,10 ^d	0,74 ± ,01 ^{a,b}	0,44 ± 0,004 ^e	133,29 ± 2,95 ^d	153,39 ± 2,04 ^c	5,78 ± 0,02 ^{d,e,f}	5,87 ± 0,03 ^{a,b}
8	10,46 ± 0,69 ^b	5,15 ± 0,10 ^d	0,71 ± 0,02 ^{b,c}	0,43 ± 0,003 ^{e,f}	145,46 ± 4,02 ^c	183,34 ± 2,33 ^b	5,74 ± 0,01 ^{f,g}	5,84 ± 0,01 ^{b,c}
10	11,92 ± 0,69 ^a	5,22 ± 0,07 ^d	0,77 ± 0,02 ^a	0,44 ± 0,006 ^e	146,79 ± 1,74 ^c	199,16 ± 3,47 ^a	5,71 ± 0,01 ^g	5,81 ± 0,01 ^{c,d,e}
12	9,68 ± 0,70 ^b	5,17 ± 0,08 ^d	0,68 ± 0,04 ^c	0,44 ± 0,004 ^e	154,15 ± 2,67 ^c	204,66 ± 5,58 ^a	5,71 ± 0,02 ^g	5,81 ± 0,01 ^{c,d,e}

Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre as duas embalagens e os sete momentos de análise.

APÊNDICE B - Análise estatística do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre as coordenadas L*, a* e b* do sistema CIELAB. Teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Semanas	L*		a*		b*	
	papel	laminado	papel	laminado	papel	laminado
0	49,26 ± 0,21 ^c	49,38 ± 0,21 ^c	-13,20 ± 0,16 ⁱ	-13,27 ± 0,09 ⁱ	29,33 ± 0,31 ^{a,b}	29,54 ± 0,16 ^a
2	48,09 ± 0,24 ^{d,e}	48,72 ± 0,15 ^{c,d}	-11,98 ± 0,02 ^h	-12,50 ± 0,23 ^h	28,69 ± 0,12 ^c	28,86 ± 0,13 ^c
4	47,60 ± 0,39 ^e	49,01 ± 0,08 ^c	-10,51 ± 0,15 ^f	-11,06 ± 0,30 ^g	28,86 ± 0,06 ^c	28,20 ± 0,10 ^{d,e}
6	47,86 ± 0,28 ^e	49,50 ± 0,10 ^c	-8,91 ± 0,25 ^d	-9,82 ± 0,05 ^e	28,87 ± 0,13 ^c	27,81 ± 0,05 ^e
8	48,04 ± 0,27 ^{d,e}	50,45 ± 0,05 ^b	-7,55 ± 0,05 ^c	-8,70 ± 0,22 ^d	28,88 ± 0,09 ^{b,c}	27,06 ± 0,20 ^f
10	47,51 ± 0,55 ^e	51,32 ± 0,23 ^a	-6,60 ± 0,27 ^b	-7,87 ± 0,17 ^c	28,64 ± 0,09 ^{c,d}	26,32 ± 0,20 ^g
12	48,14 ± 0,44 ^{d,e}	51,47 ± 0,10 ^a	-5,90 ± 0,13 ^a	-7,02 ± 0,07 ^b	28,46 ± 0,15 ^{c,d}	24,88 ± 0,12 ^h

Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre as duas embalagens e os sete momentos de análise.

APÊNDICE C - Análise estatística do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre as funções de cor h° , C^* e ΔE^* dos sistemas CIELAB e CIELCH. Teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Semanas	h°		C^*		ΔE^*	
	papel	laminado	papel	laminado	papel	laminado
0	114.22 ± 0,05 ^a	114.20 ± 0,04 ^a	32.16 ± 0,34 ^a	32.38 ± 0,18 ^a	0 ± 0,00 ⁱ	0 ± 0,00 ⁱ
2	112.65 ± 0,12 ^b	113.42 ± 0,31 ^{a,b}	31.09 ± 0,10 ^{b,c}	31.45 ± 0,20 ^b	1.82 ± 0,21 ^h	1.23 ± 0,09 ^h
4	110.01 ± 0,26 ^d	111.41 ± 0,50 ^c	30.71 ± 0,08 ^{c,d}	30.29 ± 0,18 ^{d,e}	3.21 ± 0,22 ^{f,g}	2.63 ± 0,22 ^g
6	107.15 ± 0,53 ^{e,f}	109.45 ± 0,08 ^d	30.21 ± 0,06 ^{d,e}	29.49 ± 0,06 ^{f,g}	4.55 ± 0,40 ^e	3.86 ± 0,15 ^{e,f}
8	104,66 ± 0,12 ^h	107,82 ± 0,31 ^e	29,85 ± 0,08 ^{e,f}	28,42 ± 0,26 ^h	5,80 ± 0,18 ^d	5,31 ± 0,35 ^d
10	102,98 ± 0,47 ⁱ	106,64 ± 0,25 ^f	29,39 ± 0,15 ^{f,g}	27,47 ± 0,23 ⁱ	6,87 ± 0,40 ^{b,c}	6,59 ± 0,22 ^c
12	101,71 ± 0,20 ⁱ	105,76 ± 0,09 ^g	29,06 ± 0,17 ^g	25,85 ± 0,14 ^j	7,44 ± 0,22 ^{a,b}	8,07 ± 0,07 ^a

Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre as duas embalagens e os sete momentos de análise.

APÊNDICE D - Análise estatística do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de clorofila a, clorofila b e clorofila total. Teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Semanas	Clorofila a ¹		Clorofila b ¹		Clorofila total ¹	
	papel	laminado	papel	laminado	papel	laminado
0	2,98 ± 0,09 ^a	2,94 ± 0,05 ^a	1,05 ± 0,02 ^a	1,07 ± 0,01 ^a	4,04 ± 0,11 ^a	4,00 ± 0,05 ^a
2	2,15 ± 0,04 ^{c,d}	2,15 ± 0,03 ^{c,d}	0,90 ± 0,03 ^b	0,90 ± 0,02 ^b	3,05 ± 0,07 ^{c,d}	3,05 ± 0,05 ^{c,d}
4	1,89 ± 0,05 ^{d,e}	1,63 ± 0,05 ^{e,f,g}	0,86 ± 0,01 ^{b,c}	0,84 ± 0,02 ^{b,c}	2,74 ± 0,06 ^{d,e,f}	2,47 ± 0,07 ^{f,g}
6	1,92 ± 0,13 ^{d,e}	1,57 ± 0,08 ^{f,g}	0,84 ± 0,05 ^{b,c}	0,88 ± 0,03 ^b	2,75 ± 0,18 ^{d,e,f}	2,45 ± 0,11 ^{f,g}
8	2,95 ± 0,11 ^a	1,78 ± 0,18 ^{e,f}	0,61 ± 0,06 ^d	0,84 ± 0,04 ^b	3,56 ± 0,14 ^b	2,62 ± 0,16 ^{e,f}
10	2,56 ± 0,18 ^b	1,46 ± 0,10 ^{g,h}	0,62 ± 0,03 ^d	0,76 ± 0,04 ^{b,c}	3,18 ± 0,17 ^c	2,22 ± 0,13 ^{g,h}
12	2,31 ± 0,11 ^{b,c}	1,19 ± 0,02 ^h	0,63 ± 0,02 ^d	0,77 ± 0,02 ^c	2,94 ± 0,13 ^{c,d,e}	1,96 ± 0,03 ^h

Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre as duas embalagens e os sete momentos de análise.

¹ mg/g (b.s.)

APÊNDICE E - Análise estatística do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de feofitina a, feofitina b e feofitina total. Teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Semanas	Feofitina a ¹		Feofitina b ¹		Feofitina total ¹	
	papel	laminado	papel	laminado	papel	laminado
0	4,61 ± 0,15 ^a	4,55 ± 0,06 ^a	2,21 ± 0,05 ^a	2,16 ± 0,05 ^a	6,81 ± 0,20 ^a	6,72 ± 0,11 ^a
2	3,38 ± 0,09 ^c	3,38 ± 0,04 ^c	1,76 ± 0,04 ^b	1,81 ± 0,06 ^b	5,14 ± 0,12 ^{c,d}	5,19 ± 0,09 ^c
4	3,13 ± 0,06 ^{c,d}	2,66 ± 0,08 ^e	1,46 ± 0,06 ^{c,d}	1,46 ± 0,04 ^{c,d}	4,60 ± 0,11 ^{e,f}	4,12 ± 0,12 ^{f,g,h}
6	3,07 ± 0,18 ^{c,d}	2,44 ± 0,13 ^{e,f}	1,54 ± 0,10 ^{c,d}	1,63 ± 0,06 ^{b,c}	4,61 ± 0,28 ^{d,e,f}	4,06 ± 0,19 ^{g,h}
8	4,75 ± 0,09 ^a	2,73 ± 0,25 ^{d,e}	1,21 ± 0,08 ^e	1,75 ± 0,09 ^b	5,96 ± 0,17 ^b	4,48 ± 0,33 ^{e,f,g}
10	4,74 ± 0,12 ^a	2,21 ± 0,12 ^{f,g}	0,98 ± 0,02 ^f	1,45 ± 0,04 ^{c,d}	5,72 ± 0,13 ^b	3,66 ± 0,17 ^{h,i}
12	3,97 ± 0,25 ^b	1,87 ± 0,03 ^g	0,99 ± 0,06 ^f	1,37 ± 0,04 ^{d,e}	4,97 ± 0,20 ^{c,d,e}	3,23 ± 0,05 ⁱ

Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre as duas embalagens e os sete momentos de análise.

¹ mg/g (b.s.)

APÊNDICE F - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a umidade.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: UMIDADE %

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	295.02372381	22.69413260	126.74	0.0001
Error	28	5.01366667	0.17905952		
Corrected Total	41	300.03739048			
	R-Square	C.V.	Root MSE	UMIDADE Mean	
	0.983290	5.921396	0.4231543	7.1461905	

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EMB	1	193.02860952	193.02860952	1078.01	0.0001
TEMPO	6	55.31135714	9.21855952	51.48	0.0001
EMB*TEMPO	6	46.68375714	7.78062619	43.45	0.0001

APÊNDICE G - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a atividade de água.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: AW atividade de água

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	0.87376190	0.06721245	276.76	0.0001
Error	28	0.00680000	0.00024286		
Corrected Total	41	0.88056190			
	R-Square	C.V.	Root MSE	AW Mean	
	0.992278	2.873234	0.0155839	0.5423810	

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EMB	1	0.60960952	0.60960952	2510.16	0.0001
TEMPO	6	0.16752857	0.02792143	114.97	0.0001
EMB*TEMPO	6	0.09662381	0.01610397	66.31	0.0001

APÊNDICE H - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de TBARS.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: TBARS nmol/g (b.s.)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	----------------	-------------	---------	--------

Model	13	28443.476181	2187.959706	144.36	0.0001
Error	28	424.366067	15.155931		
Corrected Total	41	28867.842248			
	R-Square	C.V.	Root MSE	TBARS Mean	
	0.985300	2.599790	3.8930619	149.74524	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EMB	1	6067.215238	6067.215238	400.32	0.0001
TEMPO	6	17570.251981	2928.375330	193.22	0.0001
EMB*TEMPO	6	4806.008962	801.001494	52.85	0.0001

APÊNDICE I - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre o pH.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: PH

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	0.14545000	0.01118846	37.29	0.0001
Error	28	0.00840000	0.00030000		
Corrected Total	41	0.15385000			
	R-Square	C.V.	Root MSE	PH Mean	
	0.945401	0.297859	0.0173205	5.8150000	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EMB	1	0.06171667	0.06171667	205.72	0.0001
TEMPO	6	0.07606667	0.01267778	42.26	0.0001
EMB*TEMPO	6	0.00766667	0.00127778	4.26	0.0036

APÊNDICE J - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a coordenada L*.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: L L*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	66.23923095	5.09532546	67.72	0.0001
Error	28	2.10673333	0.07524048		
Corrected Total	41	68.34596429			
	R-Square	C.V.	Root MSE	L Mean	
	0.969175	0.559527	0.2743000	49.023571	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F

EMB	1	38.19053571	38.19053571	507.58	0.0001
TEMPO	6	11.52168095	1.92028016	25.52	0.0001
EMB*TEMPO	6	16.52701429	2.75450238	36.61	0.0001

APÊNDICE K - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a coordenada a*.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: A a*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	243.66281190	18.74329322	603.93	0.0001
Error	28	0.86900000	0.03103571		
Corrected Total	41	244.53181190			
	R-Square	C.V.	Root MSE		A Mean
	0.996446	-1.828614	0.1761696		-9.6340476

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EMB	1	6.69602143	6.69602143	215.75	0.0001
TEMPO	6	235.28732857	39.21455476	1263.53	0.0001
EMB*TEMPO	6	1.67946190	0.27991032	9.02	0.0001

APÊNDICE L - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a coordenada b*.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: B b*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	64.07921190	4.92917015	217.26	0.0001
Error	28	0.63526667	0.02268810		
Corrected Total	41	64.71447857			
	R-Square	C.V.	Root MSE		B Mean
	0.990184	0.534689	0.1506257		28.170714

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EMB	1	17.65411667	17.65411667	778.12	0.0001
TEMPO	6	29.33139524	4.88856587	215.47	0.0001
EMB*TEMPO	6	17.09370000	2.84895000	125.57	0.0001

APÊNDICE M - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre h°.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: H h°

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	666.47376429	51.26721264	619.94	0.0001
Error	28	2.31553333	0.08269762		
Corrected Total	41	668.78929762			
	R-Square	C.V.	Root MSE		H Mean
	0.996538	0.264506	0.2875719		108.72024
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EMB	1	50.22773571	50.22773571	607.37	0.0001
TEMPO	6	595.00761429	99.16793571	1199.16	0.0001
EMB*TEMPO	6	21.23841429	3.53973571	42.80	0.0001

APÊNDICE N - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre C*.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: C C*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	124.66521190	9.58963168	297.88	0.0001
Error	28	0.90140000	0.03219286		
Corrected Total	41	125.56661190			
	R-Square	C.V.	Root MSE		C Mean
	0.992821	0.601166	0.1794237		29.845952
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EMB	1	10.91400238	10.91400238	339.02	0.0001
TEMPO	6	99.26309524	16.54384921	513.90	0.0001
EMB*TEMPO	6	14.48811429	2.41468571	75.01	0.0001

APÊNDICE O - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre ΔE*.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: DELTAE delta E*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	286.15998095	22.01230623	414.79	0.0001

Error	28	1.48593333	0.05306905		
Corrected Total	41	287.64591429			
	R-Square	C.V.	Root MSE	DELTAE Mean	
	0.994834	5.620671	0.2303672	4.0985714	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EMB	1	0.85714286	0.85714286	16.15	0.0004
TEMPO	6	283.34801429	47.22466905	889.87	0.0001
EMB*TEMPO	6	1.95482381	0.32580397	6.14	0.0003

APÊNDICE P - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de clorofila *a*.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: CHLA mg/g (b.s.)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	13.22238095	1.01710623	102.49	0.0001
Error	28	0.27786667	0.00992381		
Corrected Total	41	13.50024762			
	R-Square	C.V.	Root MSE	CHLA Mean	
	0.979418	4.731926	0.0996183	2.1052381	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EMB	1	3.54380952	3.54380952	357.10	0.0001
TEMPO	6	7.14058095	1.19009683	119.92	0.0001
EMB*TEMPO	6	2.53799048	0.42299841	42.62	0.0001

APÊNDICE Q - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de clorofila *b*.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: CHLB mg/g (b.s.)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	0.78325000	0.06025000	57.38	0.0001
Error	28	0.02940000	0.00105000		
Corrected Total	41	0.81265000			
	R-Square	C.V.	Root MSE	CHLB Mean	
	0.963822	3.927722	0.0324037	0.8250000	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EMB	1	0.06482143	0.06482143	61.73	0.0001
TEMPO	6	0.63740000	0.10623333	101.17	0.0001

EMB*TEMPO	6	0.08102857	0.01350476	12.86	0.0001
-----------	---	------------	------------	-------	--------

APÊNDICE R - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de clorofila total.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: CHLT mg/g (b.s.)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	14.78241190	1.13710861	88.62	0.0001
Error	28	0.35926667	0.01283095		
Corrected Total	41	15.14167857			

R-Square	C.V.	Root MSE	CHLT Mean
0.976273	3.865058	0.1132738	2.9307143

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EMB	1	2.63000238	2.63000238	204.97	0.0001
TEMPO	6	10.35342857	1.72557143	134.49	0.0001
EMB*TEMPO	6	1.79898095	0.29983016	23.37	0.0001

APÊNDICE S - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de feofitina a.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: PHEA mg/g (b.s.)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	37.84659048	2.91127619	155.78	0.0001
Error	28	0.52326667	0.01868810		
Corrected Total	41	38.36985714			

R-Square	C.V.	Root MSE	PHEA Mean
0.986363	4.029183	0.1367044	3.3928571

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EMB	1	13.10408571	13.10408571	701.20	0.0001
TEMPO	6	14.47785714	2.41297619	129.12	0.0001
EMB*TEMPO	6	10.26464762	1.71077460	91.54	0.0001

APÊNDICE T - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de feofitina b.

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: PHEB mg/g (b.s.)					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	5.31218095	0.40862930	110.16	0.0001
Error	28	0.10386667	0.00370952		
Corrected Total	41	5.41604762			
	R-Square	C.V.	Root MSE		PHEB Mean
	0.980822	3.917375	0.0609059		1.5547619
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EMB	1	0.46937143	0.46937143	126.53	0.0001
TEMPO	6	4.31011429	0.71835238	193.65	0.0001
EMB*TEMPO	6	0.53269524	0.08878254	23.93	0.0001

APÊNDICE U - Análise de variância do efeito da embalagem e do tempo de armazenagem sobre a concentração de feofitina total.

Analysis of Variance Procedure					
Dependent Variable: PHET mg/g (b.s.)					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	44.50899048	3.42376850	110.90	0.0001
Error	28	0.86446667	0.03087381		
Corrected Total	41	45.37345714			
	R-Square	C.V.	Root MSE		PHET Mean
	0.980948	3.551736	0.1757094		4.9471429
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EMB	1	8.61334286	8.61334286	278.99	0.0001
TEMPO	6	29.53152381	4.92192063	159.42	0.0001
EMB*TEMPO	6	6.36412381	1.06068730	34.36	0.0001