

ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

ALEXANDRE TIMM DO ESPIRITO SANTO

**EXTRAÇÃO DE CAFEÍNA E COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS
DE ERVA-MATE POR TRÊS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO: INFUSÃO, CAMPO ELÉTRICO
MODERADO E FLUIDO SUPERCRÍTICO**

Porto Alegre

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



**EXTRAÇÃO DE CAFEÍNA E COMPOSTOS COM ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE ERVA-MATE POR TRÊS
PROCESSOS DE EXTRAÇÃO: INFUSÃO, CAMPO ELÉTRICO
MODERADO E FLUIDO SUPERCRÍTICO**

ALEXANDRE TIMM DO ESPIRITO SANTO

ENGENHEIRO QUÍMICO

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO CASSEL

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. RUBEM MÁRIO FIGUEIRÓ VARGAS

Tese realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre
Março, 2020**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**EXTRAÇÃO DE CAFEÍNA E COMPOSTOS COM ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE ERVA-MATE POR TRÊS
PROCESSOS DE EXTRAÇÃO: INFUSÃO, CAMPO ELÉTRICO
MODERADO E FLUIDO SUPERCRÍTICO**

CANDIDATO: ALEXANDRE TIMM DO ESPIRITO SANTO

Esta Tese de Doutorado foi julgada para obtenção do título de DOUTOR EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

DR. EDUARDO CASSEL - ORIENTADOR

DR. RUBEM MÁRIO FIGUEIRÓ VARGAS - COORIENTADOR

BANCA EXAMINADORA

**DRA. LÍGIA DAMASCENO FERREIRA MARCZAK - DEPARTAMENTO DE
ENGENHARIA QUÍMICA - UFRGS**

DRA. ROSANA FILIP - UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

DRA. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE - DO PGETEMA - PUCRS

Ficha Catalográfica

E77e Espirito Santo, Alexandre Timm do

Extração de cafeína e compostos com atividades antioxidantes das folhas de erva-mate por três processos de extração : infusão, campo elétrico moderado e fluido supercrítico / Alexandre Timm do Espirito Santo. – 2020.

109 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cassel.

Co-orientador: Prof. Dr. Rubem Mário Figueiró Vargas.

1. *Ilex paraguariensis*. 2. Descafeinização. 3. Atividade antioxidante. 4. Extração. I. Cassel, Eduardo. II. Vargas, Rubem Mário Figueiró. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

*Success is not final, failure is not
fatal, it is the courage to continue
that counts*

(Winston Churchill)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos orientadores Prof. Dr. Eduardo Cassel e Prof. Dr. Rubem Mário Figueiró Vargas pelo apoio e a confiança depositada em mim para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Operações Unitárias da PUCRS, em especial aos colegas de pós-graduação pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Aos bolsistas de iniciação científica e estagiários envolvidos diretamente no desenvolvimento deste trabalho.

À ervateira Baldo S.A. pelo apoio no desenvolvimento deste projeto

À CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
SUMÁRIO	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE QUADROS	13
LISTA DE ABREVIACÕES	14
LISTA DE SÍMBOLOS	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVO	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1. Processamento da erva-mate	23
3.1.1. Compostos Bioativos	25
3.1.1.1. Metilxantinas	25
3.1.1.2. Polifenóis	26
3.2. Técnicas de extração	28
3.2.1. Extração por fluido supercrítico (EFS)	28
3.2.2. Campo elétrico moderado (CEM).....	31
3.3. Modelagem matemática de processos extrativos	34
3.4. Análise de extratos da erva-mate	36
3.4.1. Cromatografia	36
3.4.2. Espectrometria de Massa	37
3.4.3. Análise do Potencial Antioxidante	38
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS	41
4.1. Artigo 1: Efeito do processo de branqueamento na extração de cafeína e compostos antioxidantes das folhas de erva-mate por extração aquosa: infusão e assistida por campo elétrico moderado	41
4.1.1. Objetivos Específicos.....	41
4.1.2. Metodologia	42

4.1.2.1. Erva-mate	42
4.1.2.2. Processo extrativo	42
4.1.2.2.1 <i>Extração por infusão (IF)</i>	42
4.1.2.2.2 <i>Extração por campo elétrico moderado (CEM)</i>	43
4.1.2.3. Análise de cafeína	44
4.1.2.4. Análise Antioxidante.....	45
4.1.2.5. Modelagem Matemática.....	45
4.1.2.6. Análises Microscópicas.....	46
4.1.2.7. Análise estatística	47
4.1.3. Resultados e discussões	48
4.1.3.1. Análise Microscópica	48
4.1.3.2. Extração da cafeína	49
4.1.3.3. Modelagem Matemática.....	51
4.1.3.4. Atividade Antioxidante.....	54
4.1.4. Conclusão	57
4.2. Artigo 2: Otimização do processo de descafeinização da erva-mate por extração com fluido supercrítico.....	58
4.2.1. Objetivos Específicos.....	58
4.2.2. Metodologia	59
4.2.2.1. Erva-mate	59
4.2.2.2. Extração com fluido supercrítico	59
4.2.2.2.1 <i>Etapa 1 – Avaliação do tempo</i>	61
4.2.2.2.2 <i>Etapa 2 – Planejamento experimental por fatorial 2²</i>	62
4.2.2.2.3 <i>Etapa 3 – Planejamento experimental por Box-Benhken</i>	63
4.2.2.3. Modelagem matemática da extração supercrítica.....	66
4.2.2.4. Análise de cafeína na erva-mate	67
4.2.2.5. Análise da capacidade antioxidante da erva-mate após o processo de extração por fluido supercrítico	68
4.2.2.6. Avaliação da quantidade de cafeína ingerida no chimarrão.....	68
4.2.2.6.1 <i>Procedimento experimental</i>	68
4.2.2.6.2 <i>Modelagem matemática</i>	69
4.2.2.7. Análise e purificação do extrato	71
4.2.2.7.1 <i>Tratamento inicial do extrato</i>	71
4.2.2.7.2 <i>Planejamento experimental da purificação do extrato</i>	71

4.2.3. Resultados e discussões	72
4.2.3.1. Etapa 1 – Avaliação do tempo	73
4.2.3.2. Etapa 2 – Planejamento experimental por fatorial 2^2	73
4.2.3.3. Etapa 3 - Planejamento experimental por Box-Benhken.....	76
4.2.3.4. Modelagem matemática.....	82
4.2.3.5. Capacidade antioxidante da erva-mate após o processo de extração por fluido supercrítico	84
4.2.3.6. Avaliação da quantidade de cafeína ingerida no chimarrão.....	86
4.2.3.6.1 <i>Modelagem Matemática</i>	87
4.2.3.7. Análise e purificação do extrato	89
4.2.3.7.1 <i>Tratamento inicial do extrato</i>	89
4.2.3.7.2 <i>Planejamento experimental da purificação do extrato</i>	89
4.2.4. Conclusão	92
5. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	94
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Publicação de estudos científicos com a temática de produtos descafeinados desde 2000 até 2019. (Fonte: <i>Web of Science</i>)	19
Figura 3.1. Diagrama de fase do dióxido de carbono pressão <i>versus</i> temperatura ..	29
Figura 3.2. Representação esquemática do processo de eletroporação em uma célula vegetal.....	33
Figura 3.3 - Estabilização do radical livre DPPH	40
Figura 4.1 - Fluxograma do aparato para extração por infusão.....	43
Figura 4.2 - Fluxograma do equipamento para extração por campo elétrico moderado (CEM).	44
Figura 4.3 – Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão de folhas de erva-mate <i>in natura</i> e branqueadas com aumento de 2100 vezes.....	48
Figura 4.4 – Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão para folhas de erva-mate <i>in natura</i> e branqueadas com aumento de 6300 vezes....	49
Figura 4.5 – Massa de cafeína <i>versus</i> tempo de extração para erva-mate <i>in natura</i> e branqueada processada por infusão.	52
Figura 4.6 – Massa de cafeína <i>versus</i> tempo de extração de para erva-mate <i>in natura</i> e branqueada processada em campo elétrico moderado.	52
Figura 4.7 – EC ₅₀ (g extrato/g DPPH) dos extratos obtidos por infusão após 2 h de reação com DPPH.....	55
Figura 4.8 - EC ₅₀ (g extract/g DPPH) dos extratos obtidos por extração por campo elétrico moderado após 2 horas de reação com DPPH.	55
Figura 4.9 - Fluxograma da unidade piloto de EFS utilizada para realizar os experimentos.....	60
Figura 4.10 - Etapas de extração supercrítica para remoção de cafeína da erva-mate	61
Figura 4.11 - Representação em três dimensões de um planejamento de três níveis: completo com 27 experimentos (esquerda); e Box-Behnken com 13 experimentos (direita).....	64

- Figura 4.12 Representação esquemática do processo utilizado para simular a quantidade de cafeína obtida a cada servida; constituído por uma cuia e um *trap* acoplado a uma bomba de vácuo 69
- Figura 4.13 - Superfície de resposta de concentração de cafeína (% g caf/g EM) para vazão de CO₂ *versus* razão de etanol (modificador) para o processo de extração de cafeína por fluido supercrítico das folhas de erva-mate. 75
- Figura 4.14 - Superfície de resposta da concentração de cafeína nas folhas de erva-mate processada (% g caf/g EM): tempo de extração *versus* vazão de CO₂, com vazão de etanol fixado no nível médio..... 78
- Figura 4.15 – Superfície de resposta da concentração de cafeína nas folhas de erva-mate processada (% g caf/g EM): tempo de extração *versus* vazão de etanol, com vazão de CO₂ fixado no nível médio..... 79
- Figura 4.16 - Superfície de resposta da concentração de cafeína nas folhas de erva-mate processada (% g caf/g EM): vazão de etanol *versus* vazão de CO₂, com tempo de extração fixado no nível médio 80
- Figura 4.17 – Curva de extração massa de extrato *versus* tempo obtida pelo processo de extração supercrítica a partir das folhas de erva-mate nas seguintes condições experimentais: 950 g/h de CO₂, 106 g/h de etanol e 4,25 h de extração..... 83
- Figura 4.18 – Curva de extração massa de cafeína *versus* tempo obtida pelo processo de extração supercrítica a partir das folhas de erva-mate nas seguintes condições experimentais: 950 g/h de CO₂, 106 g/h de etanol e 4,25 h de extração..... 84
- Figura 4.19 – Capacidade antioxidante das diluições (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,00; 2,00) dos extratos aquosos a 60 °C para folhas de erva-mate antes e depois do processo de extração supercrítica. 85
- Figura 4.20 Curva de massa de cafeína obtida pontualmente *versus* número de servidas (N) para um processo que simula o método de preparo tradicional do chimarrão utilizando erva-mate antes e depois do processo de extração supercrítica..... 87
- Figura 4.21 - Massa de cafeína *versus* número de servidas no preparo do chimarrão para erva-mate antes e depois da extração por fluido supercrítico. 88
- Figura 4.22 - Superfície de resposta da concentração de cafeína (m/m) no extrato purificado: temperatura *versus* concentração de extrato bruto..... 91
- Figura 4.23 – Imagem do extrato de erva-mate antes (esquerda) e depois (direita) do processo de purificação. 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Cafeína extraída de folhas de erva-mate <i>in natura</i> (IN) e branqueadas (BR) por infusão (IF).....	50
Tabela 4.2 - Cafeína extraída de folhas de erva-mate <i>in natura</i> (IN) e branqueadas (BR) por extração com campo elétrico moderado (CEM) a 30 °C.....	50
Tabela 4.3 – Difusividade mássica de cafeína (D), coeficiente de partição (K) e coeficiente de determinação (R^2) para erva-mate IN e BR utilizando os métodos IF e CEM	53
Tabela 4.4 – Planejamento experimental fatorial 2^2 para as variáveis independentes para extração de folhas de erva-mate sapecada por fluido supercrítico.	63
Tabela 4.5 – Planejamento experimental Box-Behnken para as variáveis independentes para extração de cafeína das folhas de erva-mate sapecadas por fluido supercrítico.....	65
Tabela 4.6 – Planejamento experimental 2^2 para as variáveis independentes para purificação do extrato seco obtido pela extração por fluido supercrítico.	72
Tabela 4.7 - Resultado da avaliação do tempo (Etapa 1) no processo de extração de cafeína por fluido supercrítico das folhas de erva-mate (EM).	73
Tabela 4.8 - Resultados do planejamento de experimento por fatorial 2^2 (Etapa 2) no processo de extração de cafeína por fluido supercrítico das folhas de erva-mate (EM).....	74
Tabela 4.9 - Resultados do planejamento de experimento por Box-Behnken (Etapa 3) no processo de extração de cafeína por fluido supercrítico das folhas de erva-mate (EM).	76
Tabela 4.10 – Massas de extrato e cafeína ao longo do processo de extração por fluido supercrítico na condição otimizada (950 g/h de CO ₂ , 106 g/h de etanol e 4,25 h) das folhas de erva-mate.....	82
Tabela 4.11 - Coeficiente interno de transferência de massa (kTM), coeficiente de partição (K) e coeficiente de determinação do modelo matemático proposto para a extração do chimarrão.....	89
Tabela 4.12 - Resultados do planejamento de experimento por fatorial 2^2 da purificação do extrato de erva-mate da extração por fluido supercrítico.	90

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 – Etapas do processamento industrial da erva-mate.....	24
Quadro 3.2 - Principais tecnologias assistidas por eletricidade e suas aplicações mais usuais.....	32
Quadro 4.1 - Variáveis de processo e seus respectivos valores definidos para a extração supercrítica de cafeína da erva-mate empregadas no estudo da relação tempo de extração <i>versus</i> concentração de cafeína.	62

LISTA DE ABREVIações

CEM	Campo elétrico moderado
CO ₂	Dióxido de carbono
m/m	razão mássica
UV	Ultravioleta
EFS	Extração por Fluido Supercrítico
FS	Fluido Supercrítico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de fotiodo
UV-Vis	Ultravioleta e visível
EL	Espalhamento de luz
EM	Espectrometria de massa
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
FTMS	Espectrometria de massa com transformada de Fourier
RMN	Ressonância magnética nuclear
ABTS	ácido 2,20-azino-bis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
FRAP	Poder antioxidante redutor de ferro
ORAC	Capacidade de absorção de radicais de oxigênio
IF	Extração por infusão
IN	Erva-mate <i>in natura</i>
BR	Erva-mate branqueada
LATEPA	Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos
MET	Microscópio eletrônico de transmissão
EC ₅₀	50% da concentração inicial de DPPH
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>Abs</i>	Absorbância

LISTA DE SÍMBOLOS

C	Concentração de cafeína	mg/mg
t	Tempo	s
D	Difusividade mássica da cafeína	m ² /s
x	Coordenada onde ocorre da difusividade	m
l	Semi-espessura da folha de erva-mate	m
a	Parâmetro matemático	m
M_{∞}	Massa máxima de cafeína	mg
M_t	Massa de cafeína para cada tempo	mg
q_n	Parâmetro matemático	
K	Coefficiente de partição	
R^2	Coefficiente de determinação	
Y	Resposta predita	
β_0	Constante	
β_n	Coefficientes	
X_n	Variáveis independentes	
$C(z, t)$	Concentração do extrato na fase vapor	kg/m ³
$q(z, t)$	Concentração de extrato na erva-mate	kg/kg
v	Velocidade intersticial do solvente	m/s
ε	Porosidade do leito	
k_{TM}	Coefficiente interno de transferência de massa	s ⁻¹
ρ_s	Massa específica da erva-mate	kg/m ³
K	Constante de equilíbrio entre as fases	
W	Taxa mássica de solvente	kg/s
V	Volume da cuia	m ³
C	Concentração de cafeína na fase vapor	kg/m ³
q	Concentração de cafeína na erva-mate	kg/kg
ρ	Massa específica do solvente	kg/m ³

RESUMO

ESPIRITO SANTO, Alexandre Timm do. **Extração de cafeína e compostos com atividade antioxidante das folhas de erva-mate por três processos: infusão, campo elétrico moderado e fluido supercrítico.** Porto Alegre. 2019. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

O processamento industrial da erva-mate submete a planta a altas temperaturas a fim de conservá-la e conferir sabor e aroma. Uma etapa deste processo é denominada branqueamento, que tem por finalidade inativar enzimas oxidativas presentes nas folhas. Para avaliar a influência desta etapa na obtenção de cafeína e compostos antioxidantes, realizou-se extrações por infusão a 30, 60 e 90 °C e extrações por campo elétrico moderado a 0, 25 e 180 V a 30°C. Os resultados demonstraram que se obteve maior quantidade de cafeína para ambos os métodos de extração antes do processo de branqueamento, por sua vez os compostos que possuem atividade antioxidante foram obtidos em maior quantidade após o branqueamento. Esta diferença de comportamento pode ser justificada pelas alterações causadas na estrutura celular vegetal observadas por microscopia eletrônica de transmissão. Na busca de obter-se uma erva-mate descafeinada optou-se por utilizar a extração por fluido supercrítico com dióxido de carbono como solvente e etanol como modificador. Foram realizados experimentos em três etapas que avaliaram as seguintes variáveis de processo: vazão de solvente, vazão de modificar e tempo. A otimização aplicada através de planejamentos experimentais resultou numa condição de extração capaz de obter-se erva-mate com concentração de cafeína de 0,163% ± 0,058% em 4,25 h de extração. Também foram realizados experimentos de purificação dos extratos sem a utilização de solventes tóxicos (utilizando-se apenas água e etanol) e foram obtidos extratos de erva-mate com concentração de cafeína de até 92,34%.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, descafeinização, atividade antioxidante, extração.

ABSTRACT

ESPIRITO SANTO, Alexandre Timm do. **Caffeine and compounds with antioxidant activity extraction from yerba mate leaves by three processes: infusion, moderated electric field and supercritical fluid.** Porto Alegre. 2019. PhD Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The industrial processing of the yerba mate undergoes it at high temperatures in order to conserve it and confer flavor and aroma. One step in this process is called bleaching, which has the purpose of inactivating oxidative enzymes present in leaves of yerba mate. To evaluate the effect of this step to obtaining caffeine and antioxidant compounds, extractions were performed by aqueous infusion at 30, 60 and 90 ° C and extractions by moderate electric field at 0, 25 and 180 V. The results showed that a higher amount of caffeine was obtained for both extraction methods before the bleaching process. In turn, the compounds that have antioxidant activity were obtained in greater amount after bleaching. This behavioral difference may be explained by changes in plant cell structure observed by transmission electron microscopy. In order to obtain a decaffeinated yerba mate, supercritical fluid extraction with carbon dioxide as solvent and ethanol as modifier was chosen. Experiments were performed in three steps that evaluated the following process variables: solvent flow rate, modifier flow rate and time. The optimization applied through experimental designs resulted in an extraction condition capable of obtaining yerba mate with $0.163\% \pm 0.058\%$ caffeine concentration in 4.25 h of extraction. Experiments were also carried out to purify the extracts without using toxic solvents (only water and ethanol were used) and extracts of yerba mate with a caffeine concentration of up to 92.34% were obtained.

Keywords: *Ilex paraguariensis*, decaffeination, antioxidant activity, extraction.

1. INTRODUÇÃO

A cultura sul-americana moderna é composta, basicamente, pela mistura de influências indígenas, africanas e de colonizadores europeus, e ao longo dos séculos essas interações resultaram em uma cultura única e diversificada ao longo do continente. A erva-mate é um exemplo bem-sucedido de uma tradição indígena que foi incorporada na sociedade atual, sendo um símbolo da região sudoeste da América do Sul (Argentina, Uruguai, Paraguai e sul do Brasil). Porém, com os avanços tecnológicos, tanto no cultivo da planta, quanto no conhecimento dos benefícios de saúde ligados à planta, o consumo da erva-mate não se restringe somente ao continente sul-americano (Bracesco et al., 2011; Gómez-Juaristi et al., 2018). Tradicionalmente, o consumo de erva-mate se dá através de bebidas (chimarrão, tererê e mate), mas novos produtos, como cosméticos e nutracêuticos que contenham erva-mate vêm sendo desenvolvidos e produzidos a fim de aproveitar os benefícios para a saúde relacionados ao consumo da planta (Heck and De Mejia, 2007).

Para atingir os padrões de sabor e aroma, a planta sofre um processamento térmico e, algumas vezes, é envelhecida. Esse processamento da erva-mate pode alterar a composição dos extratos obtidos e compreender essas alterações é importante quando se busca obter compostos presentes na planta (Isolabella et al., 2010; Silva et al., 2019). Este é um tema que já vem sendo abordado pela comunidade científica (Esmelindro et al., 2002; Isolabella et al., 2010; Schmalko and Alzamora, 2001), o que denota a sua importância, porém está longe de estar esgotado.

Talvez o mais notório composto presente na erva-mate seja a cafeína. O consumo de cafeína possui seus benefícios, além de agir como estimulante do sistema nervoso central. Entretanto, uma parcela da população possui restrições ao seu consumo, tanto que cerca de 10% do mercado de café, uma matéria-prima rica em cafeína, é movimentado através de produtos que tiveram sua concentração de

caféina reduzida (Mazzafera, 2012; Fredholm et al., 1999). Os estudos científicos, na base de dados da plataforma *Web of Science*, em relação a produtos descafeinados tiveram aumento nos últimos 20 anos, conforme apresentado na Figura 1.1 e as áreas de conhecimento que mais se destacam são: nutricional e ciência de alimentos.

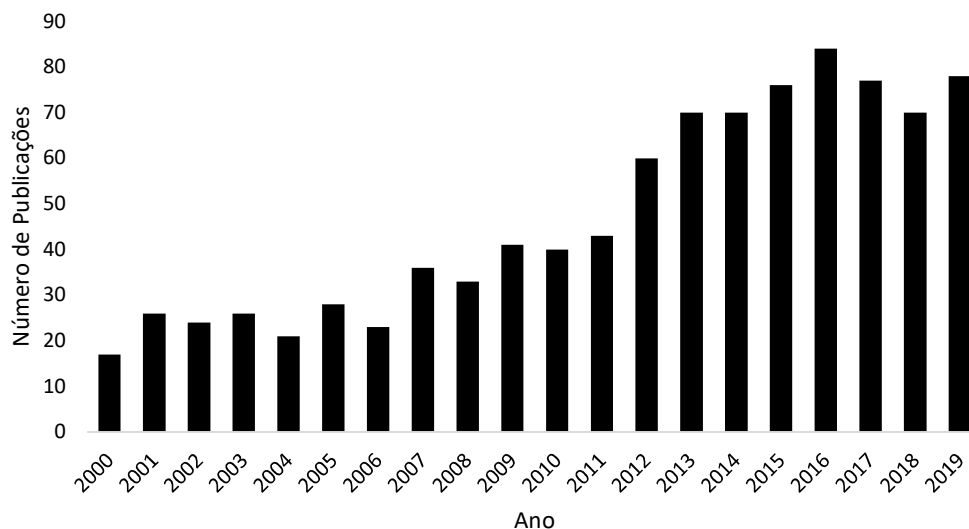


Figura 1.1 - Publicação de estudos científicos com a temática de produtos descafeinados desde 2000 até 2019. (Fonte: *Web of Science*)

Para a redução do teor de caféina nas folhas de erva-mate a tecnologia de extração supercrítica se apresenta promissora, por se tratar de uma metodologia bastante seletiva a este composto. Sua aplicação a outras plantas e alguns estudos com erva-mate (Cassel et al., 2010; Saldaña et al., 1999) demonstraram a capacidade da técnica em extrair caféina de matrizes vegetais (Kim et al., 2008; Peker et al., 1992). Portanto, o desenvolvimento da extração supercrítica voltada à erva-mate pode proporcionar um produto similar a erva-mate tradicional, porém com a sua concentração de caféina reduzida.

Também estão presentes nas folhas de erva-mate compostos polifenólicos que estão relacionados às propriedades farmacológicas atribuídas a esta planta. Uma propriedade que se destaca é a atividade antioxidante obtida nos extratos de erva-mate (Bortoli et al., 2018; Santos et al., 2017; Silva et al., 2019). Visando obter extratos com estas propriedades, diferentes técnicas extrativas podem ser aplicadas,

entretanto este trabalho irá se deter na extração por fluido supercrítico, na infusão e com a aplicação de campo elétrico moderado (CEM).

A extração por campo elétrico moderado (CEM) é uma tecnologia que se fundamenta na geração de um campo para promover a formação de poros na membrana celular, sendo assim possível extrair compostos da planta (Loghavi et al., 2009). Este método extrativo pode ser aplicado nas folhas de erva-mate para obtenção de compostos com propriedades farmacológicas, como por exemplo, atividade antioxidante proveniente dos polifenóis (Bortoli et al., 2018; Santos et al., 2017; Silva et al., 2019). Além do CEM, a extração por fluido supercrítica e a infusão também serão avaliadas neste trabalho para obtenção de extratos com potencial antioxidante.

Isto posto, este trabalho foi estruturado em dois artigos que têm como proposta desenvolver:

- Artigo 1 – estudos sobre a influência do processamento da erva-mate na obtenção de compostos bioativos presentes nas folhas da planta por diferentes métodos de extração.
- Artigo 2 – processo extrativo com fluido supercrítico com a finalidade de reduzir a concentração de cafeína presente na erva-mate, e ao mesmo tempo, obter extratos ricos em cafeína.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é obter erva-mate descafeinada utilizando extração por fluido supercrítico, assim como extratos bioativos por três diferentes métodos de extração: campo elétrico moderado, fluido supercrítico e infusão.

Os objetivos específicos do trabalho são:

- extrair cafeína e compostos que possuam atividade antioxidante da erva-mate *in natura* e branqueada por métodos destrutivos (infusão e campo elétrico moderado);
- realizar modelagem matemática das extrações por infusão e campo elétrico moderado;
- avaliar a influência da estrutura celular da erva-mate resultantes do sapeco na obtenção de cafeína e compostos antioxidantes por infusão e campo elétrico moderado.
- otimizar o processo de extração supercrítica da erva-mate, visando obter concentração de cafeína menor do que 0,1% (m/m), avaliando as variáveis: tempo, vazão de CO₂ supercrítico e etanol (modificador).
- realizar a modelagem matemática da extração por fluido supercrítico, relacionando a massa de cafeína e a massa total de extrato com o tempo de extração.
- avaliar a atividade antioxidante de extratos aquosos de erva-mate, utilizando folhas antes e depois da extração por fluido supercrítico.

- analisar a concentração de cafeína, bem como a atividade antioxidante do extrato obtido por extração supercrítica.
- aumentar a concentração de cafeína nos extratos obtidos por fluido supercrítico através da extração líquido-sólido.
- avaliar a concentração de cafeína em um processo semelhante ao preparo do chimarrão, utilizando folhas de erva-mate antes e depois da extração por fluido supercrítico.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Processamento da erva-mate

A *Ilex paraguariensis* A. St.-Hill, popularmente conhecida como erva-mate, não é consumida pela população como um produto *in natura*. O material vegetal sofre um processamento industrial, visando conferir aromas e sabores específicos, além de conservá-lo. Entre as operações unitárias do processo, destaca-se o branqueamento ou sapeco que tem por objetivo desativar as enzimas oxidantes presentes nas folhas. Durante o processamento da matéria-prima pode haver alguma mudança na matriz vegetal, alterando a concentração de algum composto e, até mesmo, a estrutura da folha. Estas modificações podem facilitar ou dificultar a extração de algum determinado componente (Esmelindro et al., 2002; Holowarty, et al., 2016; Isolabella et al., 2010; Schmalko and Alzamora, 2001). O conhecimento das etapas de processamento se faz necessário para se buscar em que estágio do processo é possível obter a maior quantidade de um princípio ativo de erva-mate (Isolabella et al., 2010).

O processamento industrial da erva-mate pode variar em relação ao tempo e à temperatura, assim como algumas etapas podem ser removidas, conforme as características que se buscam para um mercado consumidor específico. Os cinco principais estágios são: colheita, branqueamento, secagem, envelhecimento e empacotamento. As etapas do processo são descritas detalhadamente no Quadro 3.1.

Quadro 3.1 – Etapas do processamento industrial da erva-mate

Etapa	Característica
Colheita	As folhas verdes são cortadas, manualmente ou mecanicamente, e transportadas para a unidade de processamento (ervateira).
Branqueamento (Sapeco)	A erva-mate verde é aquecida rapidamente, normalmente pela queima de madeira, em um cilindro rotativo para inativação das enzimas oxidativas e há a perda de até 25% da umidade inicial. Para atender o mercado brasileiro é utilizada a temperatura de 400 °C por até 8 min; já para o mercado argentino pode-se utilizar 500 °C de 10 s até 3 min e 120 a 140 °C por até 40 s.
Secagem (Barbaquá)	As folhas são expostas a uma corrente de ar quente e com isso são aquecidas. Os sistemas utilizados são cilindros rotativos e esteiras. A erva-mate brasileira é seca a 90-110 °C por 3 h em esteira e a 350 °C por 30 min em cilindro rotativo. A erva-mate argentina inicialmente fica de 3 a 5 min a 80-100 °C e então é seca em esteira por até 3 h a 90-110 °C.
Envelhecimento (Estacionamento)	A planta já seca é triturada de forma grosseira e é disposta em câmaras de envelhecimento para conferir ao produto final suas características de aroma e sabor. O envelhecimento pode ser natural ou forçado. Neste último há controle de temperatura e umidade para acelerar o processo. O produto destinado ao mercado brasileiro não sofre envelhecimento, já a erva-mate argentina fica de 9 a 12 meses neste estágio, quando o envelhecimento é natural, ou em torno de 60 dias quando este é forçado.
Empacotamento	A erva-mate é misturada, moída e embalada para a comercialização.

Fonte: (Butiuk et al., 2016; Cardozo Junior e Morand, 2016; Heck e de Mejia, 2007; Isolabella et al., 2010; Schmalco e Alzamora, 2001).

Nos equipamentos mais tradicionais, durante os processos térmicos, sapeco e secagem, as folhas de erva-mate são expostas diretamente às chamas e ao ar quente da queima madeira. Isto contribui para a formação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), que são um grupo de substâncias que compreendem anéis aromáticos fundidos sem nenhum heteroátomo ou substituinte, formados pela combustão incompleta de matéria orgânica. Nas últimas décadas, a crescente preocupação com os HPAs como contaminantes de alimentos está relacionado à

segurança dos alimentos, já que alguns HPA são carcinogênicos, além de outros efeitos tóxicos (EMA, 2010; IARC, 2010; Thea et al., 2016).

3.1.1. Compostos Bioativos

O extrato de erva-mate é rico em uma variedade de compostos que possuem atividades biológicas benéficas para a saúde. Entre as principais substâncias bioativas extraídas da erva-mate estão os polifenóis, as saponinas e as metilxantinas (Resende et al., 2012). Extratos aquosos foram caracterizados por De Souza et al. (2011) contendo vários compostos fenólicos tais como ácido clorogênico, formado por ácidos cafeicos esterificados por ácidos quínicos e vários isômeros. Além destes compostos, estão presentes metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina) e alguns flavonoides glicosídeos, principalmente a rutina.

3.1.1.1. *Metilxantinas*

Um dos principais grupos de compostos presentes nas folhas de erva-mate são as metilxantinas. Os três principais componentes deste grupamento encontrados na erva-mate são: cafeína, teobromina e teofilina. As propriedades estimulantes do consumo da erva-mate estão ligadas a estas metilxantinas (Anesini et al., 2012; Filip et al., 1998). A concentração de cafeína pode variar de 1% até 2% em massa para a planta seca, enquanto a teobromina, segunda metilxantina mais abundante na *I. paraguariensis*, apresenta concentrações entre 0,3% a 0,9% em massa (Heck e de Mejia, 2007). A ingestão diária de cafeína e teobromina através de consumo de erva-mate pode variar entre 25-175 mg e 6-28,5 mg, respectivamente, devido às matérias-primas, dos modos de preparação e da quantidade ingerida (Cardozo Junior e Morand, 2016).

As metilxantinas podem exibir propriedades tanto oxidantes quanto pró-oxidantes (Azam et al., 2003), porém estudos voltados à comparação de extratos de café descafeinado, conduzidos por Fujioka e Shibamoto (2006), apresentaram atividade antioxidante maior do que uma preparação não-descafeinada por ensaio de ácido tiobarbitúrico. Estes resultados estão de acordo com o efeito pró-oxidante da cafeína extraída da erva-mate encontrado por Anesini et al. (2012). O comportamento

pró-oxidante da cafeína, teobromina e xantinas é explicado pela capacidade destes compostos agirem como quelantes de íons de cobre, através da redução de cobre (II) a cobre (I) (Azam et al., 2003).

A cafeína é a metilxantina encontrada em concentração mais elevada nas folhas de erva-mate. Esta apresenta uma ação estimulante no sistema nervoso central e consegue aumentar o uso de gordura como fonte de energia. Suas propriedades terapêuticas são numerosas e pode agir nos sistemas circulatório e renal, assim como melhorar a coordenação das funções cerebrais, conseqüentemente aumentando a atividade mental (Resende et al., 2012). Contudo, a ingestão de cafeína está ligada a efeitos colaterais como palpitações, distúrbios gastrointestinais, ansiedade, alteração do humor, problemas de sono e aumento da pressão arterial (Bastos et al., 2007; Fredholm et al., 1999).

A erva-mate pode ser uma fonte alternativa de metilxantinas, principalmente de cafeína que é utilizada diferentes setores da indústria: bebidas (refrigerantes e bebidas energéticas), farmacêutica (medicamentos e cosméticos) e alimentícia (Mazzafera, 2012; Mazzafera et al., 2009). Dentre os setores que utilizam a cafeína se destacam o de cosméticos e o de bebidas energéticas, este teve um aumento em 160% no mercado de 2008 a 2013. A cafeína é utilizada na fabricação de bebidas energéticas devido a suas atividades psicoativas, sendo o principal aditivo destas bebidas (Heckman et al., 2010). Também é utilizada na produção de cosmético pelas características de liberação transdérmica de fármacos, atividade anticelulite e inibição de carcinogênese na pele causado pela luz UV (Sintov and Greenberg, 2014).

3.1.1.2. *Polifenóis*

Os polifenóis são compostos produzidos pelos metabólitos secundários de plantas durante o seu desenvolvimento e esta classe de compostos é encontrada em todas as plantas. No aspecto de química estrutural, possui pelo menos um anel aromático com a presença de uma ou mais hidroxilas, podendo ser classificado em dois grandes grupos: flavonoides e não-flavonoides, que, por sua vez, possuem subgrupos. O consumo humano de polifenóis se dá principalmente através de bebidas e frutas, que têm seu aroma, sabor, cor e estabilidade oxidativa influenciados pela

presença destes compostos. Este consumo pode ser através da ingestão de alimentos que contenham naturalmente polifenóis, mas também pode ser através do enriquecimento de certos alimentos (Cvejic et al., 2017).

A atividade antioxidante dos extratos de erva-mate é atribuída aos compostos polifenólicos que deslocalizam elétrons e formam ligações intramoleculares de hidrogênio. A ingestão de erva-mate pode ser uma forma econômica e efetiva para aumentar as defesas antioxidantes (Colpo et al., 2016), já que os polifenóis são os compostos antioxidantes mais abundantes encontrados na dieta humana (Cvejic, et al., 2017). Pode-se definir compostos antioxidantes como aqueles que possuem a função de inibir ou retardar o início da oxidação e podem ser naturais ou sintéticos. O crescente interesse por antioxidantes naturais é devido à preocupação em relação à segurança de antioxidantes sintéticos, além do aumento da preferência dos consumidores por produtos naturais e com menor uso de aditivos em produtos alimentícios. Por apresentarem compostos antioxidantes naturais, especiarias e ervas são excelentes fontes de antioxidantes para a preservação de alimentos. Além disso, as fontes naturais de antioxidantes também possuem a vantagem de serem facilmente assimilados pelo organismo (Embuscado, 2015).

Os ácidos polifenólicos são um dos principais polifenóis encontrados na erva-mate. Destacam-se os compostos derivados da esterificação do ácido caféico com o ácido quínico, e a estes compostos é atribuído 90% do conteúdo fenólico total da planta (Bravo et al., 2007; da Silveira et al., 2017; Gullón et al., 2018). O ácido clorogênico é o principal composto deste grupo e é amplamente encontrado em plantas superiores (Delage et al., 1991), sendo utilizado como aditivo em bebidas, cosméticos e alimentos, bem como substâncias médicas (Butiuk et al., 2016). Possui propriedades benéficas para os seres humanos, como atividades antioxidante, hipoglicemiante, antiviral e hepatoprotetora (Farah e Donangelo, 2006).

Dois isômeros do ácido clorogênico estão presentes na erva-mate, ácido neoclorogênico e ácido criptoclorogênico, mas há também a presença de diversos outros compostos provenientes da mesma reação de esterificação, por exemplo: ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico. Presentes em elevada concentração nas folhas de erva-mate, os ácidos mono e dicafeiolquínicos

colaboram para a alta atividade antioxidante determinada em extratos de erva-mate e suas infusões, comparável a das bebidas como chás ou vinho. Estes derivados de ácidos cafeiolquínicos, através dos seus benefícios biológicos relatados, (hipocolesterolêmica, antimutagênico, anti-inflamatório, antiviral) estão relacionados à prevenção de diversos tipos de doenças (Bravo et al., 2007).

Além de ser encontrada na erva-mate, a rutina, um flavonoide cítrico, está presente em muitas plantas tropicais e também existe em muitos medicamentos chineses tradicionais. Sua concentração pode ser de 0,98 mg/g e 1,28 mg/g na erva-mate verde e comercial, respectivamente, e contribui no poder total antioxidante de extratos da erva-mate (Anesini et al., 2012). Muitos efeitos benéficos da rutina foram identificados, incluindo a inibição da agregação plaquetária, a atividade anti-inflamatória, a ação antioxidante, a redução da gordura e do colesterol no sangue. A rutina e a quercetina atuam como inibidores radicais eficientes e têm demonstrado ter atividade quimiopreventiva. Além disso, tem mostrado ação que seja um composto que apresenta efeito terapêutico frente a doenças cancerígenas (ben Sghaier et al., 2016).

3.2. Técnicas de extração

Os extratos aquosos obtidos por infusão convencional de erva-mate são os mais estudados porque é a forma que mais se assemelha ao consumo das folhas processadas desta planta (Blum-Silva et al., 2015; Brito et al., 2019; Gullón et al., 2018; da Silveira et al., 2017). Contudo, trabalhos vêm sendo realizados com outras metodologias para elucidar as vantagens de cada técnica em obter extratos provenientes da erva-mate: ultrassom (Jacques et al., 2007); alta pressão hidrostática (Kotovicz e Zanoelo, 2013; Kotovicz et al, 2014); campo elétrico moderado (da Silva et al., 2018); fluido supercrítico (Cassel et al., 2010; Fernandes et al., 2017); maceração (Jacques et al., 2006). O foco deste estudo são as técnicas de extração por fluido supercrítico, campo elétrico moderado e infusão.

3.2.1. Extração por fluido supercrítico (EFS)

O método extrativo que utiliza fluido na condição supercrítica (FS) como solvente é chamado de extração por fluido supercrítico (EFS), processo fundamentado na solubilização de compostos presentes em uma matriz líquida ou sólida pelo FS, promovendo assim a remoção seletiva de compostos específicos. Frente a métodos mais tradicionais, a EFS destaca-se por realizar o processo extrativo a temperaturas mais baixas e por usar solventes não tóxicos, quando se utiliza CO₂ como solvente. Soma-se a isso os benefícios ambientais devido ao menor consumo de energia durante o processo (Knez et al., 2014).

O FS, descoberto por Baron Charles Cagniard de la Tour em 1822, é todo e qualquer fluido que esteja numa condição de temperatura e pressão maior do que o seu ponto crítico, atingindo a região supercrítica como apresentado no diagrama de fases do dióxido de carbono na Figura 3.1. A principal diferenciação dos FS é quanto a suas propriedades físicas que se assemelham a de gases (viscosidade e difusividade) e de líquido (densidade), tornando-o um excelente solvente (Knez et al., 2014; Taylor, 1996).

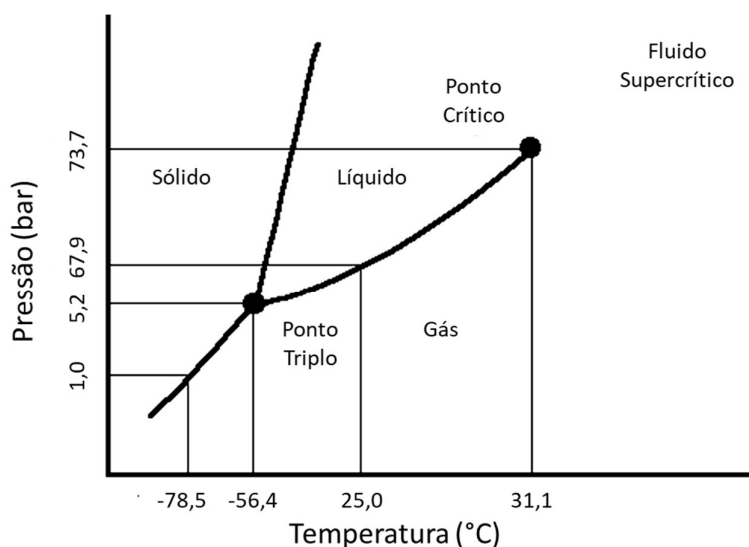


Figura 3.1. Diagrama de fase do dióxido de carbono pressão *versus* temperatura

Fonte: Adaptado de Taylor (1996).

Devido a sua baixa viscosidade e alta difusividade mássica, os FS podem se difundir facilmente através de materiais sólidos e, portanto, podem diminuir o tempo de extração. Uma das principais características do FS é a possibilidade de ter suas

propriedades físico-químicas modificadas com alteração da pressão e/ou temperatura do sistema extrativo (Herrero et al., 2006; Taylor, 1996).

O emprego da EFS a partir produtos naturais vem crescendo ao longo do tempo; de 2000 a 2013 mais de 300 plantas foram objetos de estudo. Os principais enfoques desses estudos foram: substituição de solventes orgânicos por CO₂, obtenção de extratos ricos em compostos bioativos, valorização de resíduos vegetais e partes de vegetais antes não explorados (de Melo et al., 2014). Segundo a revisão de Da Silva et al. (2016), as extrações utilizando fluido supercrítico, aplicado a produtos naturais, possuem como principais bioativos: compostos antioxidantes (41% dos estudos); compostos antitumorais (18% dos estudos); e compostos com atividade antibacteriana (10% dos estudos).

O dióxido de carbono (CO₂) é considerado o solvente universal para os processos de extração com fluidos supercríticos por apresentar baixos valores de temperatura e pressão críticas, 31°C e 72,8 bar, respectivamente. Além disto, este composto é não inflamável, inerte, atóxico, de fácil reciclagem, baixo custo e de alto poder de solvatação. A baixa polaridade do CO₂ é um fator que dificulta o uso deste solvente na extração de compostos que apresentem polaridade mais elevada. Este problema pode ser minimizado com a adição de cossolventes, também chamados de modificadores, que possuem alta polaridade e assim promovem mudanças substanciais nas propriedades do solvente em relação ao CO₂ puro (Beckman, 2004; Taylor, 1996; Valcárcel e Tena, 1997). Os modificadores também têm um papel importante na extração, permitindo a manipulação da solubilidade dos compostos de interesse na EFS. A aplicação de modificadores é cada vez mais usual em pesquisas de extração de biocompostos, sendo etanol e água os dois modificadores mais utilizados com uma proporção que pode variar entre 5% e 30% (Da Silva et al., 2016; Zulkafli et al., 2014).

De forma geral o processo de EFS pode ser dividido em três grandes etapas regidas por diferentes mecanismos de transferência de massa. O primeiro estágio é o período de taxa de extração constante, onde a superfície externa das partículas é coberta com soluto, que está facilmente acessível e a solubilidade é o mecanismo dominante de transferência de massa. A segunda etapa consiste em um período de

redução da taxa de extração, onde a quantidade de soluto na superfície externa da matriz diminui e o mecanismo de difusão inicia, operando combinado com a solubilidade. Por fim, há o período de baixa taxa de extração, onde a camada externa de soluto praticamente já foi removida e a transferência de massa ocorre principalmente por difusão dentro das partículas sólidas (da Silva et al., 2016).

3.2.2. Campo elétrico moderado (CEM)

Técnicas de aplicação de campos elétricos em alimentos surgiram como uma alternativa para processamentos térmicos convencionais. Por anos se creditava seus efeitos apenas ao aumento de temperatura pela aplicação de um campo elétrico sem efeito biológico nas células dos tecidos. Porém, estudos têm mostrado que a aplicação de um CEM possui outros efeitos não térmicos associados, efeitos esses que nem sempre foram considerados e não são completamente compreendidos (Mercali et al., 2014). No Quadro 3.2 são apresentadas as principais tecnologias que usam eletricidade aplicadas a alimentos, que podem ser divididas em pulsadas e não-pulsadas. Enquanto as técnicas pulsadas são caracterizadas por uma alta intensidade elétrica por curtos períodos de tempo, os métodos não-pulsados utilizam corrente elétrica alternada por um longo período de tempo (Rocha et al., 2018).

A técnica de campo elétrico moderado (CEM) para extração consiste na aplicação de um campo elétrico em um meio condutor com células vegetais ou animais, que podem ser consideradas um corpo condutor rodeado por uma camada dielétrica. Sob o efeito do campo, os íons se acumulam na membrana celular que, dessa forma promove a formação de poros (eletroporação). (Loghavi et al., 2009). A aplicação de um campo elétrico pode haver o aumento da temperatura, sendo este processo conhecido por aquecimento ôhmico. O CEM está relacionado apenas aos efeitos elétricos, enquanto o aquecimento ôhmico possui uma contribuição dos efeitos térmicos e elétricos (Rocha et al., 2018).

Quadro 3.2 - Principais tecnologias assistidas por eletricidade e suas aplicações mais usuais.

Campo Elétrico	Tecnologia	Principais Aplicações
Pulsado	Campo Elétrico Pulsado	Inativação não térmica de células microbianas; eletroporação de membranas celulares; amolecimento de tecidos e cascas; extração de biocompostos termicamente sensíveis
	Aquecimento Ôhmico Pulsado	Extração térmica de biocompostos
	Descarga Elétrica de Alta Voltagem	Extração de biocompostos
Não-pulsado	Aquecimento Ôhmico	Processamento térmico contínuo ou em batelada; pasteurização a alta temperatura (curto tempo) e esterilização de materiais; extração térmica de biocompostos
	Campo elétrico Moderado (CEM)	Inativação não térmica de células microbianas; extração de biocompostos
	Eletrofiltração	Separação de bioprodutos
	Eletroforese	Separação de proteínas

Fonte: Adaptado de Rocha et al. (2018).

O fenômeno de eletroporação ou eletropermeabilização pode ser descrito também como um aumento da permeabilidade da membrana celular pelo surgimento dos poros devido à aplicação de campos. A presença de um potencial induzido na membrana fornece a energia livre suficiente para rearranjar as estruturas dos fósfolípidos da membrana, permitindo a formação de poros hidrofílicos. A eletroporação na membrana celular ocorre porque a condutividade elétrica da membrana é de uma magnitude menor do que os dois meios que a circundam, o meio extracelular e o citoplasma celular, assim o campo elétrico externo é amplificado. Se o campo elétrico aplicado for superior a um valor crítico resultará num dano celular irreversível, ou seja, ocorrerá a formação de poros permanentes (Vorobiev e Lebovka, 2008). Se o campo elétrico for menor do que valor crítico os danos serão reversíveis,

isto é, quando a aplicação do campo for cessada a célula voltará a possuir uma membrana celular sem poros. Na Figura 3.2 está representado um esquema do processo de eletroporação em uma célula vegetal com danos celulares reversíveis e irreversíveis, onde há a representação de um composto interno à célula que permeia a membrana celular até atingir o meio (Vorobiev e Lebovka, 2008).

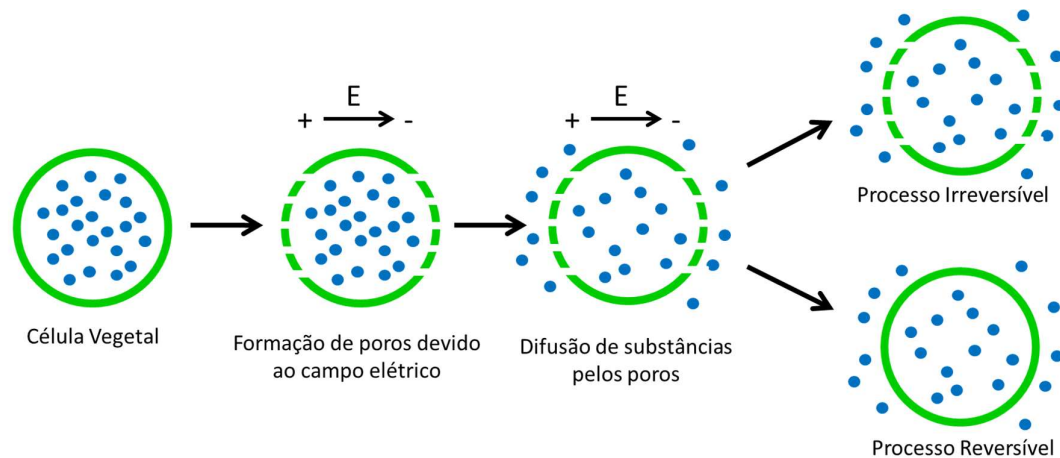


Figura 3.2. Representação esquemática do processo de eletroporação em uma célula vegetal.
Fonte: Adaptado de Vorobiev e Lebovka (2008).

A ocorrência de poros, ou seja, o aumento da permeabilidade da membrana acarreta numa menor resistência à difusão de componentes internos da célula vegetal. Se a eletropermeabilização ocorre em um tecido vegetal, tanto a condutância quanto a constante dielétrica aparente serão afetadas (Kulshrestha e Sastry, 2006). Nos processos com alimentos por CEM os efeitos de difusão são importantes para predição de perdas nutricionais, assim como o aumento da condutividade elétrica ao longo do processo (Kulshrestha e Sastry, 2003). Além dos benefícios supracitados, a tecnologia CEM também possui uma alta eficiência na conversão energética, ou seja, pode reduzir os custos operacionais no processo extrativo e também ser uma tecnologia considerada ambientalmente amigável. A aplicação de campo elétrico nem sempre é bem-sucedida para todas as matrizes, entretanto, sua aplicação ainda pode ser considerada por ser uma tecnologia com alta eficiência energética se comparada a outros métodos (Pereira e Vicente, 2010; Rocha et al., 2018).

O processamento por CEM envolve a intensidade de campo elétrico e, normalmente, a frequência de 50Hz para os Estados Unidos e Europa e 60 Hz para o Brasil, porém, sempre com campos inferiores a 1000 V/cm. Estudos vêm evidenciando que o CEM pode ter significativa influência na permeabilização em tecidos celulares eucariontes e procariontes. Conforme a exposição elétrica e térmica que a célula está exposta, em cada processamento, é possível se obter inúmeras combinações de efeitos em materiais biológicos e assim, inúmeras aplicações potenciais podem ser investigadas (Vorobiev e Lebovka, 2008).

3.3. Modelagem matemática de processos extrativos

A modelagem matemática é uma ferramenta muito útil para auxiliar no entendimento do processo de extração, assim como para relacionar o rendimento de extrato com o tempo de processo através de uma equação matemática, permitindo assim o fornecimento de dados para o *scale up* do processo. Além disso, o conhecimento do mecanismo de transferência de massa e dos parâmetros cinéticos, juntamente com as restrições termodinâmicas, podem ser usados para avaliar economicamente o processo de extração em escala laboratorial e exportar as informações para escalas piloto e industrial (Sovová, 2005). Para uma correta aplicação destes modelos, é necessário levar em conta as diversas variáveis que influenciam a extração, como por exemplo: temperatura, pressão, natureza do solvente, natureza do soluto, tempo de extração, agitação, entre diversas outras. Outro fator importante para a extração é o modo de operação, sistemas em batelada ou sistemas contínuos em relação ao solvente (Chan et al., 2014).

A dinâmica de uma extração pode ser simplificada em dois estágios, sendo o primeiro mais rápido (etapa de solubilidade) e uma etapa final mais lenta (etapa de difusão). O início de um processo extrativo é mais veloz pelo fato das moléculas de solvente penetram nas matrizes da planta, fazendo com que a camada de citoplasma seja diretamente exposta ao solvente, devido às interações soluto-solvente e ao gradiente de concentração do soluto, assim, solubilizando os solutos. No início do processo de extração, a etapa rápida corresponde a uma taxa de extração constante. Durante a segunda etapa de extração, o soluto se difunde do interior da matriz vegetal

e se dissolvem no solvente. As células que permanecem inalteradas após a primeira etapa de extração é que ditarão a dinâmica neste estágio (Chan et al., 2014; Crossley e Aguilera, 2001; Dassoff e Li, 2019). No geral, entende-se que a transferência de massa externa (solubilidade do soluto) seja inicialmente o fator limitante, enquanto a transferência de massa (difusividade mássica) se torna um fator limitante à medida que a extração prossegue (Dassoff e Li, 2019).

Modelos de lei de potência, notavelmente usados para descrever extrações sólido-líquido, também são utilizados para descrever extrações de compostos intracelulares (Vorobiev e Lebovka, 2006). A característica destes modelos são a presença de um único parâmetro ajustável, considerando o coeficiente de difusão do composto de interesse, a área de superfície total, o volume de solvente e a geometria das partículas sólidas. O modelo é bastante simples, porém limitado a condições específicas de um processo. A principal funcionalidade do modelo é representar de forma aproximada os processos de extração, porém os parâmetros não apresentam a relação física do fenômeno (da Silva, 2017).

O desenvolvimento das técnicas de extração tem levado ao aprimoramento das técnicas convencionais conjugadas a outras, como por exemplo, micro-ondas, radiação ultrassônica, campos elétricos e cargas. Esses processos podem ser incorporados na extração por solvente ou como pré-tratamento da amostra antes da extração. O CEM, como outros processos elétricos, pode gerar danos celulares na matriz vegetal, conforme apresentado na Figura 3.2, alterando a permeabilidade da membrana celular e isto influenciar na dinâmica do processo de extração. Deste modo, a transferência de massa pode ser aumentada, assim como o rendimento da extração para as etapas de solubilidade e de difusão (Chan et al., 2014). Um exemplo de aplicação de modelo para aplicação de campo elétrico foi apresentado por Kusnadi e Sastry (2012). O modelo correlaciona o coeficiente de difusividade efetivo de sal em diferentes vegetais, através do cálculo da equação da segunda lei de Fick, à mobilidade iônica com intensidades de campos e temperatura através da regressão de um polinômio linear.

Os modelos que vêm sendo estudados para a extração por fluido supercrítico podem ser divididos em dois grupos. O primeiro são os modelos de transferência de

massa que tem a cinética da transferência de massa influenciada pela interação da densidade, viscosidade e difusividade do solvente. O segundo são os modelos dependentes da solubilidade que se baseiam na formação de um complexo soluto-solvente (Dassoff e Li, 2019). Sovová et al. (1994) propuseram um modelo em que a matriz vegetal pode ser representada como um sistema composto de células rompidas, originadas do processo de moagem, e células intactas. A partir destas considerações, o modelo é separado em estágios diferentes dependendo de qual das resistências à transferência de massa considerada esteja controlando o processo de extração. Por sua vez, Reverchon (1997) apresentou um modelo que se baseia no balanço de massa em uma dimensão para o soluto como um pseudo-componente.

3.4. Análise de extratos da erva-mate

Independentemente do método extrativo utilizado, os extratos de erva-mate possuem compostos produzidos por metabólitos secundários da planta. Muitas vezes estes compostos são referidos como fitoquímicos por a eles estarem associados efeitos positivos para saúde ou no combate de doenças. Desta forma, o estudo sobre extratos de erva-mate vem despertando cada vez mais o interesse da comunidade científica no que se refere a busca de novos meios de tratamentos de enfermidades que atinjam a população. Estudos apontam que a erva-mate possui propriedades anti-inflamatórias (Lima et al., 2014), auxilia no controle da obesidade (Arçari et al., 2009), ajuda no combate a células tumorais (Frant et al., 2012), entre outros. Para um melhor entendimento destes compostos fitoquímicos é necessário um conhecimento químico de suas estruturas, bem como de suas propriedades.

3.4.1. Cromatografia

A cromatografia é uma das técnicas mais utilizadas na análise de produtos naturais devido à eficiência de separação obtida pelas diferentes metodologias cromatográficas, já que, normalmente, os extratos obtidos apresentam uma alta complexidade (Do et al., 2014). Para os extratos de erva-mate, a cromatografia desempenha um papel importante, sendo capaz de separar os diversos compostos

produzidos por metabólitos secundários presente nos extratos, sejam compostos voláteis (cromatografia gasosa) ou não voláteis (cromatografia líquida).

A fundamentação de um processo cromatográfico, de forma geral e ampla, consiste nos componentes de uma mistura serem transportados através da fase estacionária pelo fluxo da fase móvel e as separações ocorrem com base nas diferenças de velocidade de migração entre os componentes da fase móvel. Na separação por cromatografia gasosa, a amostra injetada deve ser vaporizada antes de atingir a coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte, ou seja, a fase móvel não interage com as moléculas do analito; sua única função é transportar o analito através da coluna. Na cromatografia líquida, a fase móvel é um solvente líquido, o qual interage e transporta o analito através da fase estacionária propiciando a separação dos compostos existentes (Skoog et al., 2008).

Com a evolução das metodologias empregadas e com o avanço tecnológico dos equipamentos cromatográficos, esta técnica possui grande importância para a evolução do conhecimento dos compostos bioativos da erva-mate. Um dos estudos pioneiros da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) voltado para a erva-mate, desenvolvido por Clifford e Ramirez-Marines (1990), foi comparar a constituição de alcaloides e ácidos clorogênicos de 5 amostras de erva-mate. Na última década, outras técnicas cromatográficas vêm ajudando na separação de compostos presentes nos extratos de erva-mate: cromatografia líquida de ultra performance (Blum-Silva et al., 2016), cromatografia multidimensional (Polidoro et al., 2016) e cromatografia olfatométrica (Márquez et al., 2013).

3.4.2. Espectrometria de Massa

Após a etapa de separação dos compostos presentes em extratos provenientes de produtos naturais, os mesmos precisam ser caracterizados. Este processo de análise de metabólitos secundários em plantas é uma tarefa desafiadora devido à sua diversidade química, em baixa abundância e variabilidade mesmo dentro da mesma espécie. Existem diferentes técnicas capazes de caracterizá-los, como detector de fotiodo (DAD), ultravioleta e visível (UV-Vis), espalhamento de luz (EL), fluorescência e espectrometria de massa (EM). A escolha entre estes diferentes detectores pode se dar pelo analito em estudo, entretanto, a espectrometria de massa

possui uma excelente sensibilidade e seletividade, combinado com a capacidade de elucidar ou confirmar estruturas químicas (Steinmann e Ganzera, 2011).

O entendimento dos princípios da espectrometria de massa teve seu início no século passado por Joseph John Thomson que observou que campos magnéticos e eletrostáticos defletem os raios positivos dependendo da sua massa. No entanto, a técnica precisou de avanços tecnológicos para ser empregada de forma difusa. Isso ocorreu somente depois da década de 60, seja por técnicas como ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), espectrometria de massa com transformada de Fourier (FTMS), aprisionamento de íons (ion trap), entre outras. Devido a diferentes características instrumentais em ionização, resolução, velocidade de varredura e fragmentação, a EM é uma técnica versátil com aplicações em diversas áreas de pesquisa (Steinmann e Ganzera, 2011).

A ressonância magnética nuclear (RMN) é outra técnica bastante utilizada na caracterização de metabólitos existentes extratos vegetais, possuindo a vantagem de produzir sinais que se correlacionam direta e linearmente com a abundância de compostos. Entretanto, tem como desvantagem possui menor sensibilidade frente à espectrometria de massas e o seu uso é mais indicado para metabólitos abundantes em massa, como por exemplo, açúcares em frutas (Allwood e Goodacre, 2010).

Portanto, a utilização da espectrometria de massas após um processo de separação, mais comumente a cromatografia, é uma técnica capaz de abordar os diversos compostos semi-polares, em especial os metabólitos secundários (Allwood e Goodacre, 2010). A utilização desta combinação de técnicas é amplamente utilizada na elucidação dos extratos de erva-mate. Polidoro et al. (2016) foram capazes de caracterizar até 291 compostos em extratos voláteis de erva-mate. Por sua vez, Bravo et al. (2007) propuseram uma metodologia capaz de identificar 28 compostos fenólicos presentes em extratos não voláteis da erva-mate.

3.4.3. Análise do Potencial Antioxidante

Outra forma de abordagem dos extratos de produtos naturais é realizar análises que objetivem, através de reações químicas, uma classe de compostos específicos ou de alguma propriedade conferida aos extratos pelos mesmos. Uma das análises

aplicadas para a erva-mate é da determinação do potencial antioxidante de seus extratos, sendo realizada por alguns estudos (Anesini et al., 2012; Bortoli et al., 2018; Bravo et al., 2007).

Antioxidantes são substâncias que são capazes de extinguir os radicais livres oxidativos produzidos como subprodutos do metabolismo e sua produção pode ser aumentada pela exposição a fatores como por exemplo: radiação ionizante, luz solar, fumaça de cigarro, poluentes ambientais. Alguns dos danos causados por esses estímulos nocivos são atribuídos a essa geração excessiva de radicais livres que podem danificar tecidos, proteínas e lipídios. Como os radicais são reativos, eles iniciam a reação em cadeia simultaneamente e isso pode levar ao dano ou até mesmo a morte de uma célula. Muitas doenças crônicas, como câncer e doenças cardíacas, e até mesmo o processo de envelhecimento, podem ser o resultado de danos cumulativos causados pelos radicais livres (Rao, 2016; Webb, 2017).

Os agentes antioxidantes são capazes de extinguir a reação em cadeia, eliminando intermediários de radicais livres. Ao consumir compostos antioxidantes através de alimentos ou bebidas, a extinção de radicais livres é imediata e assim pode minimizar o dano celular que eles causam, reduzindo doenças e o envelhecimento causados por danos oxidativos cumulativos (Rao, 2016; Webb, 2017).

Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para medir a capacidade antioxidante, seja pela eliminação dos radicais ABTS (ácido 2,20-azino-bis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) e DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), ou também pelo poder antioxidante redutor de ferro (FRAP) e ensaio de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC). A utilização destes métodos se dá pela facilidade e rapidez de obtenção de resultados (Chedea e Pop, 2019).

A metodologia por DPPH utiliza este reagente que é caracterizado como um radical livre estável em virtude do deslocamento do radical livre (elétron sobressalente) sobre a molécula como um todo, de forma que as moléculas não se dimerizam, como seria o caso da maioria dos radicais livres. O deslocamento também dá origem à cor violeta profunda. Quando uma solução de DPPH é misturada com a de uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, isto dá origem à forma

reduzida de DPPH com a perda desta cor violeta (Chedea e Pop, 2019). Na Figura 3.3 uma reação genérica de redução do DPPH é apresentada, onde um composto estabiliza o radical livre DPPH e com isto há uma diminuição na intensidade da cor violeta (Rufino et al., 2007). Entretanto, nem sempre a reação entre o DPPH e um composto antioxidante pode ocorrer de maneira simples e rápida. Em alguns casos, o mecanismo da reação pode ser mais complexo (Brand-Williams et al., 1995).

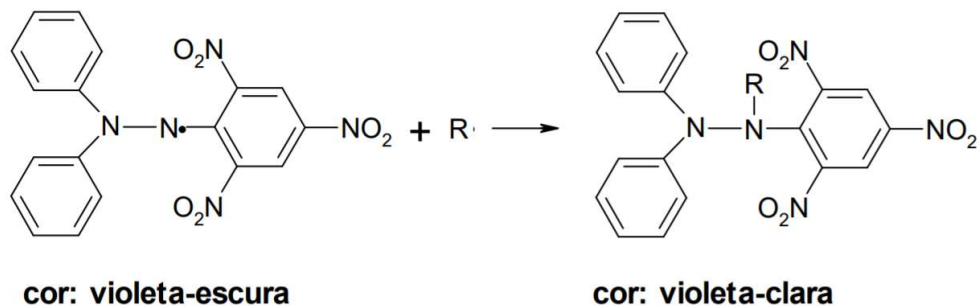


Figura 3.3 - Estabilização do radical livre DPPH

Fonte: Rufino et al. (2007).

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS

4.1. Artigo 1: Efeito do processo de branqueamento na extração de cafeína e compostos antioxidantes das folhas de erva-mate por extração aquosa: infusão e assistida por campo elétrico moderado

Este estudo busca avaliar a atividade antioxidante *in vitro* e o teor de cafeína em extratos de folhas de erva-mate antes e após o processo de branqueamento (sapeco). As técnicas de extração utilizadas são a extração por infusão (IF) e por campo elétrico moderado (CEM). Além dos dados experimentais de extração de cafeína, foi realizado o desenvolvimento de uma modelagem matemática com os dados experimentais da extração de cafeína com o objetivo de gerar informações a serem utilizadas em estudos, por exemplo, *scale-up*.

4.1.1. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- extrair cafeína e compostos antioxidante da erva-mate *in natura* e branqueada por métodos destrutivos (infusão e campo elétrico moderado);
- realizar modelagem matemática das extrações por infusão e campo elétrico moderado;
- avaliar a influência do sapeco na estrutura celular da erva-mate na obtenção de cafeína e compostos antioxidantes por infusão e campo elétrico moderado.

4.1.2. Metodologia

4.1.2.1. *Erva-mate*

As folhas de erva-mate usadas para realizar os experimentos foram fornecidas pela empresa Baldo S.A., colhidas no sul do Brasil (São Mateus do Sul - PR). Foram utilizados dois tipos de erva-mate: erva-mate *in natura* (IN) - folhas que não sofreram nenhum processamento pós colheita; erva-mate branqueada (BR) - folhas de erva-mate coletadas após o branqueamento (sapeco) (Quadro 3.1).

4.1.2.2. *Processo extrativo*

Para que as folhas de erva-mate coubessem no interior do sistema de extração, elas foram apenas cortadas, sem que houvesse qualquer processo de moagem. Duas técnicas de extração foram utilizadas nos ensaios de obtenção de cafeína e os compostos com ação antioxidante das folhas da erva-mate: extração por infusão (IF) e extração por campo elétrico moderado (CEM). Para ambos os métodos as amostras dos extratos foram coletadas nos tempos de: 2,5, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 min. Para cada condição de extração os ensaios foram feitos em duplicata.

4.1.2.2.1 Extração por infusão (IF)

As IF foram realizadas a 30, 60 e 90 °C em um béquer com tampa, onde foram aquecidos 200 mL de água destilada e, após atingir a temperatura desejada, foram adicionados 5 g de folhas de erva-mate. Durante as 2 h de experimento, o sistema foi agitado e a temperatura foi mantida constante. As 9 coletas foram realizadas nos tempos anteriormente citados, sendo que em cada uma delas o volume foi de aproximadamente 1 mL. Um agitador magnético com aquecimento foi utilizado para o controle de temperatura e homogeneização do sistema, conforme apresentado na Figura 4.1.

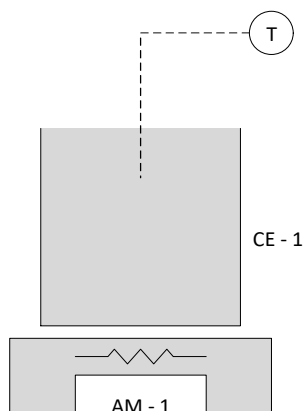


Figura 4.1 - Fluxograma do aparato para extração por infusão

Legenda: CE - célula de extração; AM - agitador magnético; T - sensor de temperatura.

4.1.2.2.2 Extração por campo elétrico moderado (CEM)

As extrações por CEM foram conduzidas no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA) da UFRGS. O equipamento (Figura 4.2) consiste em um estabilizador (Forceline, modelo EV 1000 T/2-2), um variador de voltagem (Sociedade Técnica Paulista LTDA, modelo Varivolt) e um sistema de aquisição de dados (Novus, *model field logger*) para registrar temperatura, corrente elétrica e tensão. Em uma célula de extração, os eletrodos foram imersos em água com folhas de erva-mate. O par de eletrodos tem uma distância média de 7,2 cm. Os experimentos foram realizados com 200 mL de água destilada e 3 g de erva-mate, sem adição de sais, e a agitação dentro da célula de extração foi promovida por um agitador magnético. Os experimentos por CEM foram realizados a 60 Hz para 25 V e 180 V, resultando em campos de 3,47 V/cm e 25,00 V/cm, respectivamente. As voltagens escolhidas foram em virtude dos limites operacionais do equipamento utilizado. Ambas as condições foram feitas a 30 °C. Para manter a temperatura constante durante o experimento, a célula de extração foi conectada a um banho termostático.

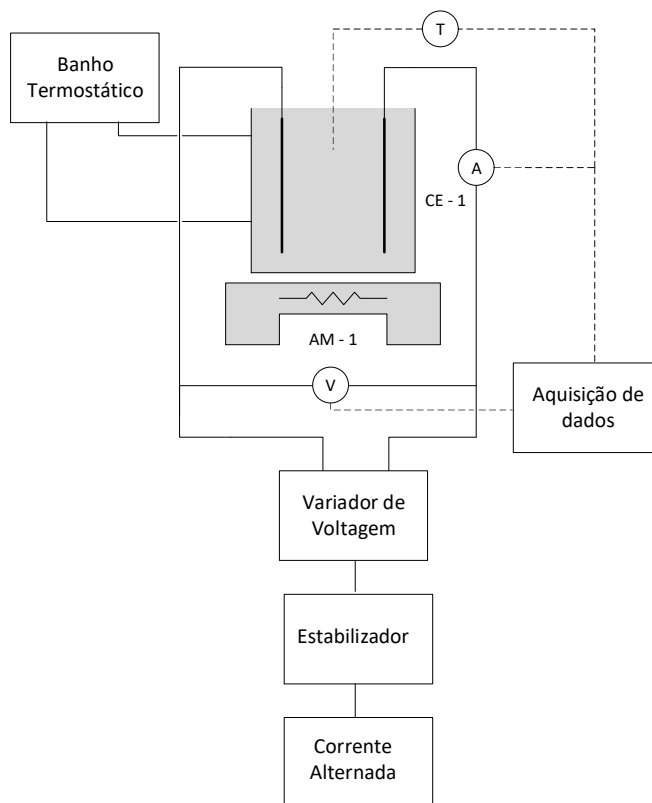


Figura 4.2 - Fluxograma do equipamento para extração por campo elétrico moderado (CEM).
 Legenda: CE - célula de extração; AM - agitador magnético; A - medidor de corrente elétrica; V - medidor de tensão; T - sensor de temperatura.

4.1.2.3. Análise de cafeína

A quantidade de cafeína nas amostras foi determinada usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) através de um equipamento Agilent Technologies Série 1200 com uma coluna Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 μ m, 150 x 4,6 mm). O comprimento de onda do detector ultravioleta foi ajustado em 273 nm, usando um Agilent 1220 Series e o volume de injeção foi de 10 μ L. A metodologia para análise foi adaptada de (Filip et al., 1998). A fase móvel consistiu em dois solventes com uma vazão de 47 g/h: (A) água:ácido acético (98:2), (B) metanol:ácido acético (98:2). O fluxo começa em 83% do solvente A e diminui constantemente para 80% em 10 min e é mantido constante por 2 min. O solvente A diminui para 0% constantemente nos próximos 5 min e o fluxo continua a 0% do solvente A durante 5 min. Para quantificar as amostras foi feita uma curva de calibração no equipamento, usando o padrão de cafeína (Sigma-Aldrich) 99% puro.

4.1.2.4. *Análise Antioxidante*

A capacidade antioxidante dos extratos foi determinada pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (Sigma-Aldrich). A redução do radical livre DPPH pela adição de extrato de erva-mate pode ser observada devido à diminuição da absorvância dessa solução. No término de cada extração, para as duas metodologias estudadas, uma amostra obtida em cada condição de extração foi coletada e mantida congelada a -18 °C até o procedimento analítico. Utilizou-se um espectrofotômetro (Biospectro SP-220) para as análises de absorvância no comprimento de onda de 515 nm com tempo de reação de 2 h e utilizou-se 2,9 mL da solução de DPPH e 0,1 mL de extrato. A concentração inicial de DPPH em uma solução de metanol foi de 60 µM e para cada amostra 3 concentrações de extrato foram preparadas para reagir com a solução de DPPH e assim determinar o EC₅₀ (quantidade de extrato necessária para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH). Para determinação do EC₅₀ em g_{extrato} por g_{DPPH} (g extrato/g DPPH), cada amostra foi seca para obtenção da quantidade de extrato para todas as condições de extração estudadas.

4.1.2.5. *Modelagem Matemática*

A modelagem matemática da extração de cafeína, para ambos os métodos de extração, foi realizada seguindo a metodologia proposta por Crank (1975). Este método consiste na difusividade mássica da cafeína presente em uma folha plana em uma solução agitada de volume limitado, resolvendo a equação de difusão (Equação 4.1) a partir de condições iniciais (Equação 4.2) e condições de contorno (Equação 4.3) definidas a partir das condições do sistema em estudo.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (4.1)$$

onde C é a concentração de cafeína, t é o tempo, D é a difusividade mássica da cafeína na folha, e x é a coordenada onde ocorre a difusividade.

$$C = 0, \quad -l < x < l, \quad t = 0 \quad (4.2)$$

onde l é a semi-espessura da folha de erva-mate.

$$a \frac{\partial C}{\partial t} = \pm D \frac{\partial C}{\partial x}, \quad x = \pm l, \quad t > 0 \quad (4.3)$$

onde a é um parâmetro obtido a partir da divisão do volume de solvente pela área total de folhas de erva-mate.

A Equação 4.4 é a solução deste problema e é possível obter valores para a difusividade mássica de cafeína de cada experimento de ambos os métodos de extração.

$$\frac{M_{\infty}}{M_t} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\alpha(1+\alpha)}{1+\alpha+\alpha^2q_n^2} \exp\left(-\frac{Dq_n^2t}{l^2}\right) \quad (4.4)$$

onde M_{∞} é a massa máxima de cafeína, obtida experimentalmente, que pode ser extraída pelo solvente na condição avaliada, M_t é a massa de cafeína para cada tempo, q_n são as raízes positivas não nulas da Equação 4.5.

$$\tan q_n = -\alpha q_n \quad (4.5)$$

Por fim, α é calculado por $\alpha = a/Kl$, onde K é coeficiente de partição.

4.1.2.6. Análises Microscópicas

Folhas de erva-mate *in natura* e branqueadas foram observadas usando um microscópio eletrônico de transmissão (MET) para avaliar os danos na estrutura celular que o processo de branqueamento pode causar. Para análise por MET, as folhas foram cortadas em formato quadrado com aproximadamente 1 mm². As amostras foram mantidas em solução fixadora com glutaraldeído 25%: paraformaldeído 8%: solução salina tamponada com fosfato 0,2M: água destilada (1:2,5:5:1,5) até a preparação da amostra para análise por MET. As amostras foram lavadas com a solução de lavagem (solução salina tamponada com fosfato 0,1 M) três

vezes durante 30 min para remover a solução fixadora para iniciar a preparação das amostras para a análise por MET.

Uma solução de tetróxido de ósmio a 2%: solução salina tamponada com fosfato 0,2 M (1:1) é aplicada nas amostras por 45 min e após isso uma lavagem é realizada com as soluções de lavagem por 15 min, três vezes. A acetona foi usada para desidratar as amostras em um gradiente crescente. As primeiras concentrações de acetona em água foram de 30%, 50% e 70% por 10 min cada. Em seguida, foi usada acetona 95% duas vezes por 10 min e 20 min. Para concluir o processo de desidratação foi utilizada acetona a 100% duas vezes por 10 min e 20 min.

A incorporação na matriz vegetal foi realizada com uma mistura do meio de incorporação (Epon 812) com a desidratação (acetona). A concentração do meio de incorporação aumenta gradualmente e para cada concentração o contato é de 2 h. Para finalizar o processo de incorporação, as amostras foram mantidas durante 24 h no meio de incorporação puro. O processo de inclusão foi realizado com moldes de silicone, com meio de incorporação puro a 60 °C por 72 h. Após a inclusão, os cortes ultrafinos de 10mm nas amostras foi realizado em um ultramicrotomo (Leica, EM UC7). Então, as amostras estavam prontas para serem colocadas nas grades e analisadas por MET. O microscópio (FEI, Tecnai G2 T20) opera a uma tensão de aceleração de 80 kV com filamento de hexaboreto de lantânio e as imagens foram coletadas com aumentos de 2100 e 6300 vezes.

4.1.2.7. *Análise estatística*

Um teste F foi realizado para detectar diferenças significativas entre os valores das diferentes amostras. Além disso, as médias e os desvios padrões foram calculados e as médias foram consideradas significativamente diferentes quando os valores de p foram inferiores a 0,1. A escolha deste valor de p foi pelo fato de estarmos trabalhando com produtos naturais.

4.1.3. Resultados e discussões

4.1.3.1. Análise Microscópica

As imagens obtidas das folhas de erva-mate, branqueada e *in natura*, pela análise microscópica, usando MET, são apresentadas na Figura 4.3 e na Figura 4.4. Com as imagens das Figura 4.3 e Figura 4.4 é possível observar que o processo de branqueamento modifica a maneira como os conteúdos internos das células são dispostos. Na erva-mate IN, o conteúdo celular é disperso por toda a célula e tem forma e características mais definidas, enquanto na erva-mate BR o conteúdo é mais concentrado perto das paredes celulares. No entanto, não há ruptura da célula e, por consequência, não há extravasamento do conteúdo interno das células. Como outros autores apontaram (Bastos et al., 2006; Butiuk et al., 2016; Isolabella et al., 2010), a alteração estrutural causada pelo branqueamento pode ter um papel fundamental na obtenção de compostos fitoquímicos da erva-mate.

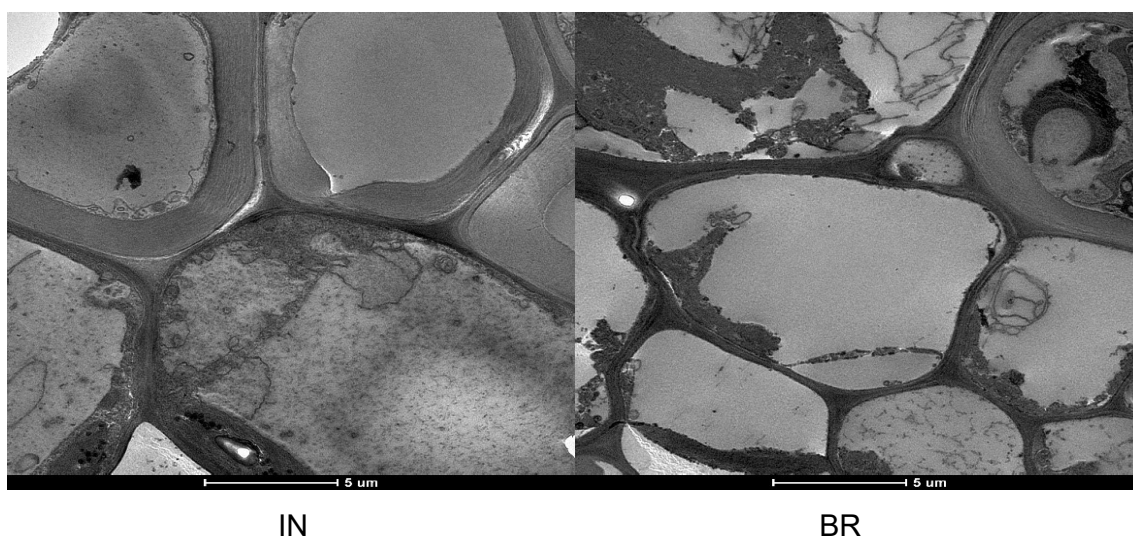


Figura 4.3 – Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão de folhas de erva-mate *in natura* e branqueadas com aumento de 2100 vezes.

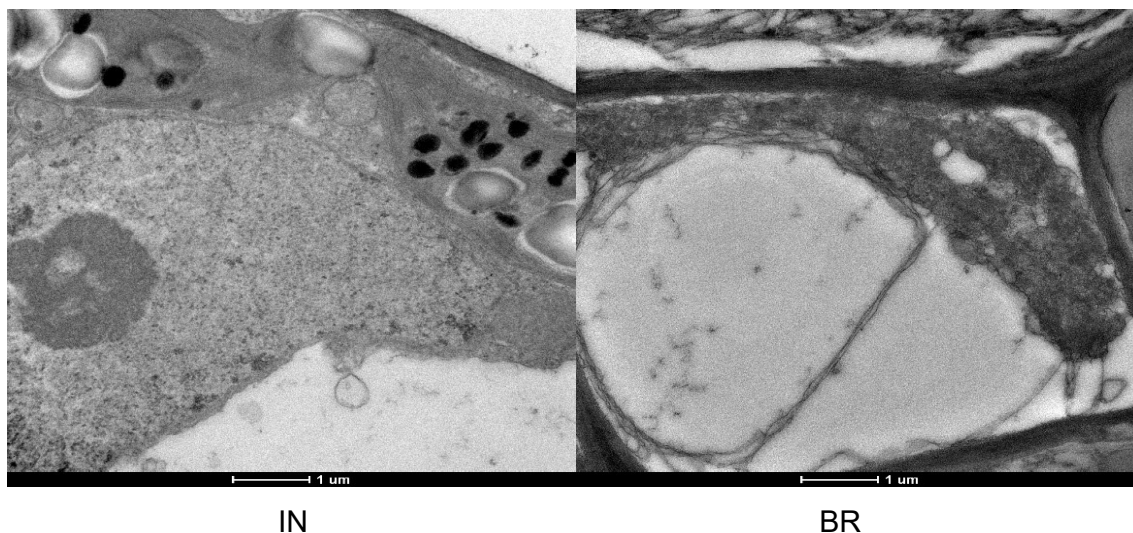


Figura 4.4 – Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão para folhas de erva-mate *in natura* e branqueadas com aumento de 6300 vezes..

4.1.3.2. *Extração da cafeína*

A cafeína total extraída após 2 h, utilizando as ervas-mate IN e BR, para infusão (IF) em todas as condições estudadas é apresentada na Tabela 4.1. Os resultados para a IF mostram que a quantidade de cafeína extraída das folhas de erva-mate pelo mesmo período foi dependente da temperatura, independentemente do processamento da erva-mate. No entanto, após o branqueamento não foi possível extrair a mesma quantidade de cafeína na mesma temperatura. Schmalko e Alzamora (2001) relataram uma perda de cafeína durante o processamento e isso pode estar relacionado ao processo de desidratação das folhas que reduzem a pressão de vapor de cafeína devido à sua solubilidade na água. Esmelindo et al. (2002) relataram uma perda de cafeína não somente após o branqueamento, mas também durante todo o processamento da erva-mate, e pode estar associada às altas temperaturas que a matriz vegetal é exposta nas etapas de branqueamento e secagem. Este fenômeno pode ser justificado pela sublimação da cafeína durante o seu processamento, já que este composto apresenta temperatura de sublimação de 178 °C na pressão atmosférica (Vaughan, 1990). Em nossos resultados, a diferença entre a massa de cafeína extraída em IN e BR foi menor quando a temperatura de extração foi aumentada. Estes resultados podem demonstrar que a perda de cafeína por

sublimação, durante os processos térmicos industriais, é mais restrita onde a cafeína pode ser facilmente extraída.

Tabela 4.1 - Cafeína extraída de folhas de erva-mate *in natura* (IN) e branqueadas (BR) por infusão (IF)

	Cafeína (mg/g erva-mate)	
	IN	BR
IF 30 °C	6,03 ^d ± 0,11	3,59 ^e ± 0,08
IF 60 °C	11,41 ^c ± 0,29	10,38 ^b ± 0,16
IF 90 °C	18,52 ^a ± 0,14	18,14 ^a ± 0,13

Todos os dados apresentam média ± desvio padrão. Letras diferentes (a, b, c, d, e) indicam diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,1$).

Os dados de cafeína total extraída após 2 h, usando IN e BR por CEM nas condições estudadas, são apresentados na Tabela 4.2. Pode-se observar que a quantidade de cafeína por massa de planta condição em 0,00 V/cm não foi estatisticamente diferente do que na extração por IF realizada na mesma temperatura (30 °C). Isto se justifica pelo fato de se estar trabalhando em condições muito afastadas do limite de solubilidade da cafeína em água. Na temperatura de 30 °C, a concentração máxima de cafeína em água é de 25,8 mg/mL (Yalkowky et al, 2010), enquanto o maior valor observado nos ensaios nesta temperatura foi de 0,11 mg/mL.

Tabela 4.2 - Cafeína extraída de folhas de erva-mate *in natura* (IN) e branqueadas (BR) por extração com campo elétrico moderado (CEM) a 30 °C

	Cafeína (mg/g erva-mate)	
	IN	BR
CEM 0,00 V/cm	6,65 ^a ± 0,30	4,37 ^b ± 0,06
CEM 3,47 V/cm	7,08 ^a ± 0,44	6,36 ^a ± 0,25
CEM 25,00 V/cm	7,36 ^a ± 0,27	7,17 ^a ± 0,19

Todos os dados apresentam média ± desvio padrão. Letras diferentes (a, b) indicam diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,1$).

Os resultados obtidos utilizando o CEM mostram que não houve diferença significativa na aplicação desta técnica para a erva-mate IN nas condições estudadas. Quando aplicados 3,47 e 25,00 V/cm não houve aumento de cafeína extraída ao

comparar com a condição em que não foi aplicado o campo elétrico, já que foram obtidos resultados estatisticamente iguais. No entanto, para a erva-mate BR, quando os experimentos foram realizados a 3,47 ou 25,00 V/cm, houve aumento significativo de cafeína extraída ao comparar com a condição 0,00 V/cm. Isto demonstra que a variável campo elétrico influi na extração de cafeína apenas para a erva-mate BR, porém o campo de 3,47 V/cm já foi capaz de obter valores de cafeína estatisticamente iguais ao campo de 25,00 V/cm. Os resultados obtidos para o CEM, juntamente com os obtidos para IF, mostram que há perda de cafeína de fácil acesso durante o processo de branqueamento e que isto esteja associado a sublimação de cafeína nesta etapa do processamento.

4.1.3.3. *Modelagem Matemática*

Além da quantidade total de cafeína extraída após 2 h, foi realizada uma avaliação durante a extração para entender o comportamento de cada condição de extração. As análises de cafeína foram realizadas no tempo 2,5, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 min. Os resultados obtidos usando IF a 30, 60 e 90 °C são apresentados na Figura 4.5, bem como os resultados da modelagem matemática proposta por Crank (1975). Na Figura 4.6 são apresentados os resultados para o CEM a 0,00, 3,47 e 25,00 V/cm, juntamente com sua respectiva modelagem matemática.

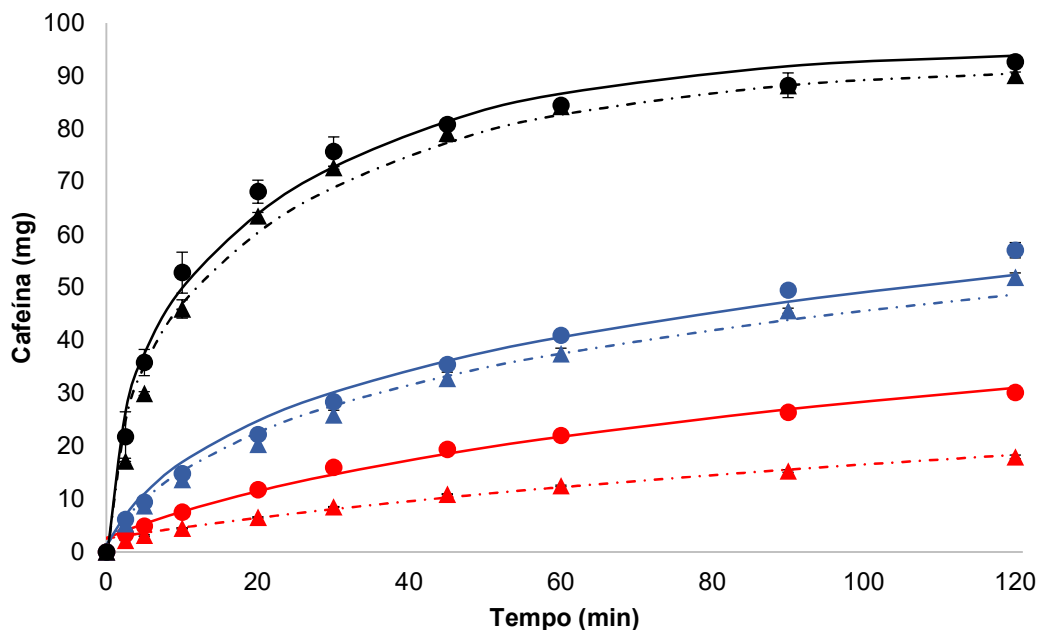


Figura 4.5 – Massa de cafeína *versus* tempo de extração para erva-mate *in natura* e branqueada processada por infusão.

Legenda: IN (●); BR (▲); modelagem matemática de IN (—); modelagem matemática de BR (— · —); experimentos a 30 °C são apresentados em vermelho, 60 °C em azul e 90 °C em preto.

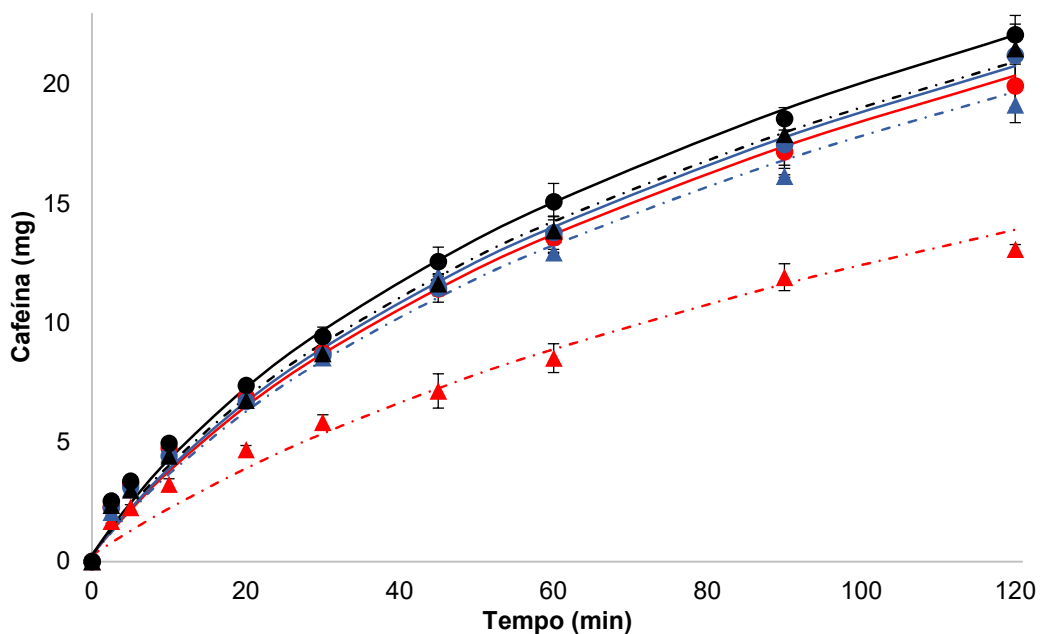


Figura 4.6 – Massa de cafeína *versus* tempo de extração de para erva-mate *in natura* e branqueada processada em campo elétrico moderado.

Legenda: IN (●); BR (▲); modelagem matemática de IN (—); modelagem matemática de BR (— · —); experimentos a 0,00 V/cm são apresentados em vermelho, 3,47 V/cm em azul e 25,00 V/cm em preto.

Os resultados apresentados nas Figura 4.5 e Figura 4.6 estão de acordo com as Tabela 4.1 e Tabela 4.2 que mostraram uma diferença significativa entre todas as temperaturas avaliadas para IF e aplicando CEM isto foi apenas observado para BR a 0,00 V/cm. Os resultados dos parâmetros difusividade mássica da cafeína (D) e fator de partição (K), assim como o coeficiente de determinação obtidos pela modelagem matemática são apresentados na Tabela 4.3. Como esperado, a difusividade mássica de cafeína obtida para todos os experimentais mostrou um aumento quando a temperatura foi aumentada nas IF, e foi observada para as ervas-mates IN e BR. Os resultados do CEM para difusividade mássica de cafeína foram semelhantes para todas as condições utilizando erva-mate IN, entretanto para as amostras BR, nas duas voltagens aplicadas, 3,47 e 25,00 V/cm, observou-se um aumento na difusividade mássica de cafeína quando comparada a 0,00 V/cm. Os dados obtidos são compatíveis aos obtidos na literatura, tal como os apresentados por Da Silva et al. (2018), que utilizou um sistema de extração semelhante ao proposto neste trabalho na extração de saponinas de frutas de erva-mate.

Tabela 4.3 – Difusividade mássica de cafeína (D), coeficiente de partição (K) e coeficiente de determinação (R^2) para erva-mate IN e BR utilizando os métodos IF e CEM

	IN			BR		
	$D \times 10^{18}$ (m ² /s)	K	R^2	$D \times 10^{18}$ (m ² /s)	K	R^2
IF 30 °C	0,71	168,15	0,990	0,28	167,32	0,981
IF 60 °C	4,21	110,09	0,994	3,69	111,72	0,996
IF 90 °C	61,47	76,90	0,991	56,98	76,90	0,994
CEM 0 V	0,63	422,67	0,996	0,34	422,67	0,988
CEM 25 V	0,65	422,67	0,995	0,63	422,67	0,994
CEM 180 V	0,73	422,67	0,996	0,71	422,67	0,995

O fator de partição foi diferente para as três temperaturas avaliadas na IF, mas para o CEM o parâmetro foi o mesmo para todas as condições, mostrando que o fator de partição está relacionado à temperatura, mas não à voltagem ou ao tipo de erva-mate. A difusividade mássica de cafeína (D) está diretamente relacionada a

temperatura, já que com o aumento desta na IF foi observado o aumento de deste parâmetro. Por sua vez, a voltagem não apresentou melhorias perceptíveis na difusividade mássica da cafeína. A erva-mate BR influenciou negativamente na difusividade mássica da cafeína, já que em todas as condições analisadas apresentou valores menores do que a erva-mate IN. Isto pode ser justificado pela perda de cafeína durante este processamento.

Além disto, todos os dados obtidos pela modelagem matemática ajustaram-se aos resultados experimentais visto que o coeficiente de determinação obtido em cada caso estudado foi maior do que 0,98.

4.1.3.4. *Atividade Antioxidante*

Ao fim das extrações uma alíquota de amostra foi coletada para a realização de ensaios da atividade antioxidante. Na Figura 4.7 estão apresentados os resultados de EC_{50} ($g_{\text{extrato}}/g_{\text{DPPH}}$) para os extratos obtidos nas três temperaturas avaliadas da IF e para as duas matérias-primas. Os extratos obtidos na maior temperatura apresentaram maior capacidade antioxidante, pois foi necessária uma menor quantidade de extrato para reduzir 50% do DPPH disponível no sistema de reação. O efeito da variável temperatura é mais significativo em termos de atividade antioxidante de extratos obtidos de amostras IN do que de extratos obtidos de amostras BR. Esse resultado, juntamente com as imagens obtidas pelo MET, indica que, durante o processo de branqueamento, as folhas de erva-mate sofrem uma alteração em sua estrutura. Isto posto, essa modificação faz com que os compostos que possuem ação antioxidante sejam extraídos mais facilmente a baixas temperaturas. A 90 °C, não se pode verificar diferenças entre a erva-mate IN e BR, já que os resultados para ambos os resultados da erva-mate são estatisticamente iguais.

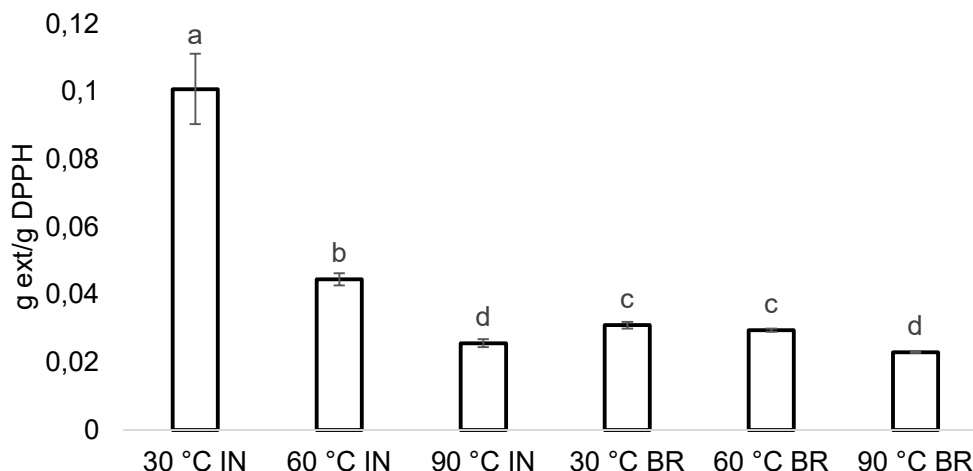


Figura 4.7 – EC₅₀ (g extrato/g DPPH) dos extratos obtidos por infusão após 2 h de reação com DPPH. Letras diferentes (a, b, c, d) indicam diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,1$).

Na extração utilizando o CEM observou-se um comportamento diferente para os tipos de erva-mate estudados, como mostra a Figura 4.8. Apenas a erva-mate IN teve maior ação antioxidante quando a voltagem foi aumentada, ou seja, incrementada a variável voltagem observou-se uma redução no EC₅₀ ($g_{\text{extrato}}/g_{\text{DPPH}}$). Por sua vez, a erva-mate BR não apresentou diferenças significativas na atividade antioxidante dentro do intervalo de voltagem proposto para a extração por CEM, bem como quando a temperatura foi aumentada na IF.

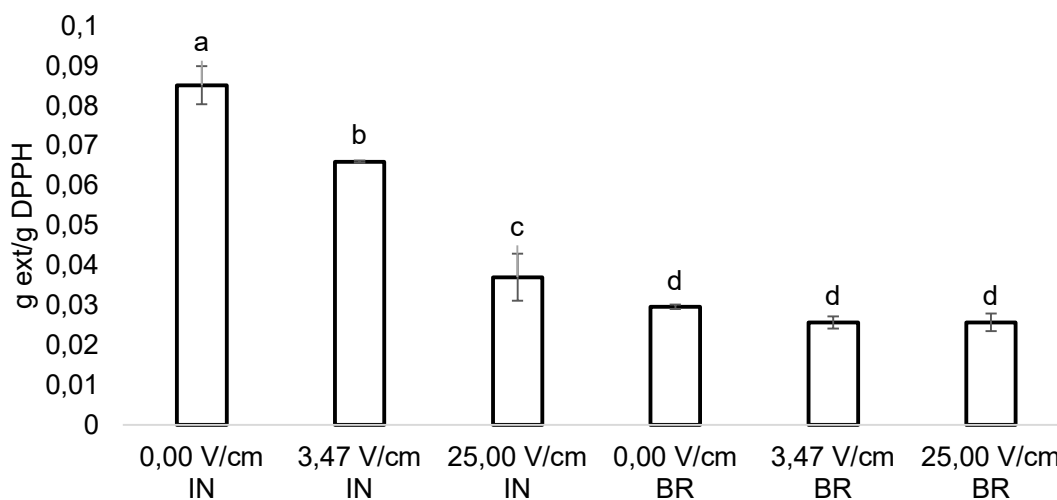


Figura 4.8 - EC₅₀ (g extract/g DPPH) dos extratos obtidos por extração por campo elétrico moderado após 2 horas de reação com DPPH.

Letras diferentes (a, b, c, d) indicam diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,1$).

O objetivo da utilização do CEM foi alterar a estrutura da matéria-prima e consequentemente aumentar o rendimento do processo (Rocha et al., 2018). Para a erva-mate IN esta proposta demonstrou-se eficaz porque observou-se aumento da atividade antioxidante do extrato. No entanto, para a planta BR este comportamento não foi verificado, podendo ser justificado pelo dano estrutural já causado pelo processamento industrial de branqueamento sofrido por esta matriz e observado nos resultados de microscopia (Figura 4.3 e Figura 4.4). O CEM é usualmente um tratamento indicado para vegetais frescos, como relatado por Sensoy e Sastry (2004) e nossos resultados de EC_{50} mostraram comportamento similar, já que após o processo de branqueamento o CEM não foi mais capaz de melhorar a atividade antioxidante dos extratos.

O processo de branqueamento mostrou resultados diferentes para a extração de cafeína e os compostos antioxidantes para ambas tecnologias. Após o processo de branqueamento foi possível obter maior quantidade de compostos antioxidantes, observando-se uma diminuição no EC_{50} , enquanto a cafeína apresentou comportamento inverso, a exceção da temperatura de 90 °C. Na temperatura mais elevada, independentemente da matéria-prima não foi observado diferença tanto na quantidade de cafeína extraída quanto na atividade antioxidante. Os resultados obtidos mostraram que uma menor quantidade de cafeína extraída na erva-mate BR não influenciou na capacidade antioxidante. Como relatado por Gülçin (2008), a cafeína tem uma atividade pró-oxidante em um ensaio de emulsão de ácido linoléico. Além disso, Anesini (2012) relacionou a atividade antioxidante da erva-mate ao ácido clorogênico, ácido cafeico e rutina; por outro lado, a cafeína induziu a oxidação lipídica do ácido linoleico atuando como um composto pró-oxidante. A diferença de solubilidade destes compostos (0,125 mg/mL para rutina, 40 mg/mL para o ácido clorogênico e menor que 1 mg/mL para o ácido cafeico (Pubchem)) em relação a cafeína (25,8 mg/mL (Yalkowky et al, 2010)) pode justificar a diferença de comportamento da atividade antioxidante a quantidade de massa de cafeína extraída.

4.1.4. Conclusão

A MET demonstrou-se uma técnica capaz de mostrar os danos na estrutura das folhas de erva-mate após o processo de branqueamento, onde foi possível observar que a organização das estruturas celulares foi alterada. Estes resultados justificam as diferenças no comportamento extrativo para a erva-mate *in natura* e branqueada. Porém, nas condições máximas avaliadas, 90 °C para a IF e 180 V para a extração por CEM, os resultados encontrados foram mais próximos, ou não se obteve resultados estatisticamente diferentes, para os tipos de erva-mate. Isto posto, pode-se concluir que para condições mais brandas de extração serão obtidos menores valores de massa de cafeína e maior atividade antioxidante quando for utilizada erva-mate que sofreu o processamento de branqueamento. Para cafeína isto pode ser justificado pela sua temperatura de sublimação, que ocorre a 178 °C em pressão atmosférica, sendo esta temperatura inferior a temperaturas utilizadas no processo de branqueamento. Entretanto, novos estudos sobre o assunto devem ser realizados para melhor elucidação, bem como avaliar o sinergismo entre o uso da temperatura e o campo elétrico para extrair compostos antioxidantes e cafeína das folhas de erva-mate.

A modelagem matemática aplicada à extração de cafeína foi capaz de representar o processo, possuindo coeficientes de determinação não inferiores a 0,98. Para o modelo aplicado, o coeficiente de partição (K) foi dependente exclusivamente da temperatura enquanto a difusividade mássica da cafeína (D) foi dependente do tipo de planta utilizado, da temperatura, para a IF, e da voltagem, para a extração por CEM.

4.2. Artigo 2: Otimização do processo de descafeinização da erva-mate por extração com fluido supercrítico.

Este estudo busca desenvolver e otimizar uma metodologia que possibilite obter erva-mate com concentração final de cafeína menor do que 0,1% (m/m) e assim ser considerada descafeinada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005). A tecnologia usando fluido supercrítico foi escolhida para realizar o processo extrativo e foi realizado planejamento experimental a fim de obter-se valores otimizados, dentro do intervalo investigado, para as variáveis de processo estudadas: vazão de solvente, vazão de modificador e tempo de extração.

4.2.1. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- otimizar o processo de extração supercrítica da erva-mate, visando obter concentração de cafeína menor do que 0,1% (m/m), avaliando as variáveis: tempo, vazão de CO₂ supercrítico e etanol (modificador);
- realizar uma modelagem matemática da extração por fluido supercrítico para massa de cafeína e para massa total de extrato obtido;
- avaliar a atividade antioxidante de extratos aquosos utilizando folhas de erva-mate antes e depois da extração por fluido supercrítico;
- analisar a concentração de cafeína, bem como a atividade antioxidante do extrato obtido por extração supercrítica;
- aumentar a concentração de cafeína nos extratos obtidos por fluido supercrítico através da extração líquido-sólido;
- avaliar a concentração de cafeína em um processo semelhante ao preparo do chimarrão utilizando folhas de erva-mate antes e depois da extração por fluido supercrítico;

4.2.2. Metodologia

4.2.2.1. *Erva-mate*

As folhas de erva-mate usadas para realizar os experimentos foram fornecidas pela empresa Baldo S.A., colhidas no sul do Brasil (São Mateus do Sul - PR). Foram utilizadas folhas de erva-mate branqueadas, ou seja, que passaram pelo processo de beneficiamento da erva-mate somente até a etapa de branqueamento (sapeco). Para homogeneizar as amostras, as folhas foram moídas em um moinho de facas e posteriormente foi selecionada a parcela da amostra entre as peneiras de abertura de 0,5 mm e 0,355 mm. Desta forma, a granulometria média das amostras utilizadas é 0,427 mm.

4.2.2.2. *Extração com fluido supercrítico*

Os experimentos de extração foram realizados no Laboratório de Operações Unitárias (LOPE) da PUCRS na unidade piloto de extração supercrítica (Figura 4.9). O processo extrativo se inicia com a alimentação do sistema com CO₂ líquido proveniente do reservatório (RE – 1). O CO₂ é refrigerado (trocador de calor TC – 1) com o objetivo de garantir que o solvente esteja na fase líquida na entrada da bomba de alta pressão. Em seguida, o solvente é pressurizado em uma bomba (B – 1) de alta pressão (Maximator® – G35). O modificador etanol (cossolvente) é acondicionado em um reservatório (RE – 2) e pressurizado por uma bomba (B – 2) de pistão (ISCO 260D). Após pressurizados, o CO₂ na condição supercrítica e o etanol se misturam e ingressam no trocador de calor (TC – 2) para que a mistura alcance a temperatura definida para o processo extrativo. A mistura de solventes entra no vaso extrator (VE – 1) de 500 mL, onde a mesma percola pelo leito formado pela matriz vegetal, neste caso as folhas de erva-mate moídas, solubilizando o extrato. O vaso extrator possui uma jaqueta de aquecimento elétrico para manter constante a temperatura do extrator ao longo do processo. Após a solubilização do extrato, a mistura solvente-soluto é direcionada para uma válvula de controle/expansão (VC – 1) (Hoke–Micromite® 1600) a fim de reduzir a pressão da mistura. Com a redução de pressão, os solventes CO₂ e etanol passam para o estado gasoso e líquido, respectivamente, deixando de solubilizar o extrato que precipita nos vasos de separação (VS – 1 e VS – 2). A válvula

de expansão conta com um sistema de aquecimento para evitar o congelamento da mesma, visto que durante a etapa de expansão do solvente há redução de temperatura devido ao efeito Joule-Thomson do CO_2 . Por fim, o CO_2 passa por um medidor de fluxo (MF – 1) (Siemens® Sitrans FC mass flow 6000) que mensura a vazão do solvente, enquanto a vazão do etanol é medida diretamente na bomba de pistão (B – 2).

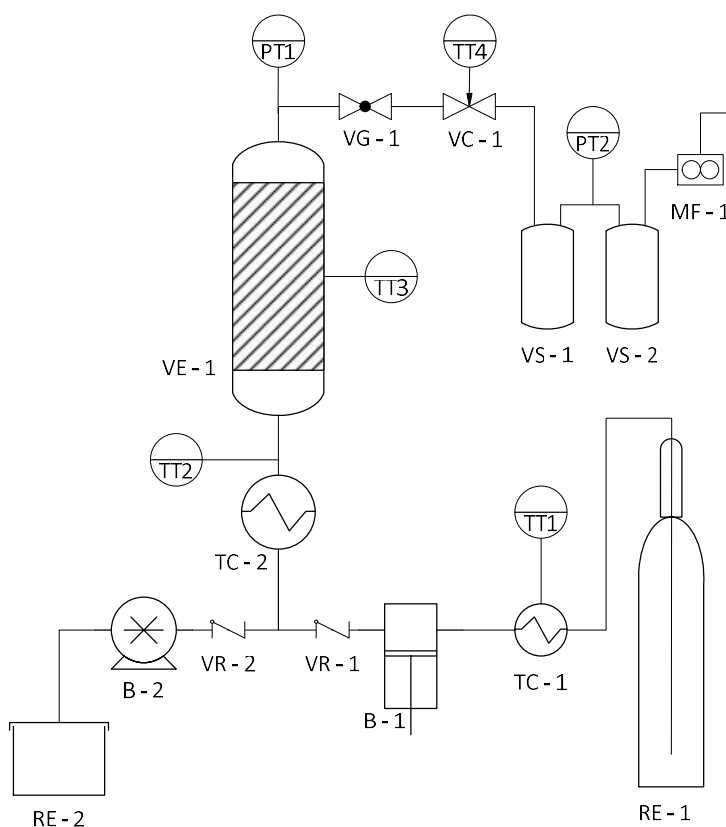


Figura 4.9 - Fluxograma da unidade piloto de EFS utilizada para realizar os experimentos.

Legenda: RE – Recipiente; TC – Trocador de calor; B – Bomba; VR – Válvula de retenção; VE – Vaso de extração; VG – Válvula globo; VC – Válvula de Controle; VS – Vaso de separação; MF – Medidor de fluxo; TT – Medidor de Temperatura; PT – Medidor de Pressão.

As extrações realizadas com o fluido supercrítico para a remoção de cafeína foram divididas em três estágios, buscando obter diferentes respostas do comportamento extrativo, a fim de se otimizar o processo. Na Figura 4.10 é apresentado um fluxograma com as três etapas do estudo, bem como as variáveis estudadas. Os resultados obtidos em uma etapa definiram os parâmetros para o estágio subsequente. As condições de pressão e temperatura não foram alteradas, por estas corresponderem aos limites máximos operacionais do equipamento (300 bar

e 60 °C). Estudos anteriores demonstraram que não é indicado utilizar valores inferiores (Franceschini, 2017).



Figura 4.10 - Etapas de extração supercrítica para remoção de cafeína da erva-mate

4.2.2.2.1 Etapa 1 – Avaliação do tempo

Inicialmente, um estudo sobre a relação entre o tempo de extração e a concentração de cafeína na erva-mate processada foi realizado. Utilizaram-se as condições operacionais definidas no trabalho de Franceschini (2017). As mesmas são apresentadas no Quadro 4.1. A única alteração realizada foi quanto à massa de erva-mate utilizada em cada extração, havendo um aumento da massa de planta de 36 g para 140 g. Ao longo do processo foram sendo feitas coletas de 2 g das folhas de erva-mate para a análise da concentração de cafeína. As análises foram realizadas nos tempos de 4,0, 5,0, 6,5 e 8,5 h de extração. Para execução de tal procedimento, a extração foi interrompida (redução a pressão atmosférica) para a remoção da amostra e em seguida o processo extrativo era recomeçado nas condições operacionais apresentadas no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 - Variáveis de processo e seus respectivos valores definidos para a extração supercrítica de cafeína da erva-mate empregadas no estudo da relação tempo de extração *versus* concentração de cafeína.

Variável	Valor
Pressão	300 bar
Temperatura	60 °C
Vazão de CO ₂	1000 g/h
Razão de modificador (etanol)	5,5% (m/m)
Massa de erva-mate	140 g
Diâmetro de partícula	0,427 mm

4.2.2.2.2 Etapa 2 – Planejamento experimental por fatorial 2²

O planejamento experimental é um processo estruturado para investigar a relação entre as variáveis controladas (*input*) do processo e os efeitos ou respostas (*output*). Portanto, representa uma melhoria em relação à abordagem experimental de um fator por vez, por fornecer informação estatística sobre o significado e magnitude de cada fator e suas interações, através do método de ANOVA (análise de variância) (Wills e Napier-Munn, 2016; Franchi, 2018; Montgomery, 2012).

Um segundo estudo da extração de cafeína das folhas de erva-mate por extração supercrítica foi realizado utilizando um planejamento experimental fatorial 2² com repetição em triplicada no ponto central. As variáveis analisadas foram vazão de CO₂ e razão de modificador (etanol). Os três níveis de vazão de CO₂ estudados foram 700, 950 e 1200 g/h (limites de operação do equipamento); e os níveis de razão mássica de etanol foram 1,00%, 3,25% e 5,00% (valores inferiores aos investigados por Franceschini (2017)), em relação a massa de CO₂. As outras condições de processo foram mantidas constantes: 300 bar, 60 °C, 5 h de extração, 140 g de erva-mate de diâmetro de partícula média de 0,427 mm. O planejamento experimental totalizou em 07 experimentos, conforme é apresentado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Planejamento experimental fatorial 2^2 para as variáveis independentes para extração de folhas de erva-mate sapecada por fluido supercrítico.

Experimento	Variáveis dependentes descodificadas		Variáveis dependentes codificadas	
	Vazão de CO ₂ (g/h)	Razão de etanol (%)	X ₁	X ₂
1	700	1,00	-1	-1
2	1200	1,00	1	-1
3	950	3,25	0	0
4	700	5,00	-1	1
5	950	3,25	0	0
6	1200	5,00	1	1
7	950	3,25	0	0

X_1 é a vazão de CO₂, X_2 é a razão de etanol

Ao término do processo, 2 g de erva-mate processada foram coletados para realizar a análise de determinação da concentração de cafeína por CLAE. Este procedimento foi realizado em duplicata para cada uma das condições definidas no planejamento experimental. A partir dos resultados obtidos do planejamento fatorial foi ajustada uma equação polinomial de segunda ordem (Equação 4.6), utilizando *software Statistica 10*®, para relacionar as variáveis independentes e a concentração de cafeína na erva-mate processada.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (4.6)$$

onde, Y é a resposta predita; X_1 e X_2 são as variáveis independentes; β_0 é uma constante, e β_1 e β_2 são os coeficientes lineares e β_{12} é o coeficiente de interação entre os fatores.

4.2.2.2.3 Etapa 3 – Planejamento experimental por Box-Benhken

O planejamento experimental clássico possui suas limitações, principalmente ao que se diz respeito ao elevado número de ensaios que são necessários para um

maior número de fatores envolvidos. Desta forma, novos estudos foram realizados para reduzir os ensaios, mas mantendo a confiabilidade do planejamento de experimental clássico (Wills e Napier-Munn, 2016; Montgomery, 2012). Box e Behnken (1960) desenvolveram um método que utiliza apenas três níveis para cada variável controlada e que também é capaz de descrever uma região sem utilizar os pontos de seus vértices. A Figura 4.11 é uma representação em três dimensões de um planejamento experimental completo de três níveis com 27 experimentos e de um planejamento Box-Behnken de três níveis com 13 experimentos.

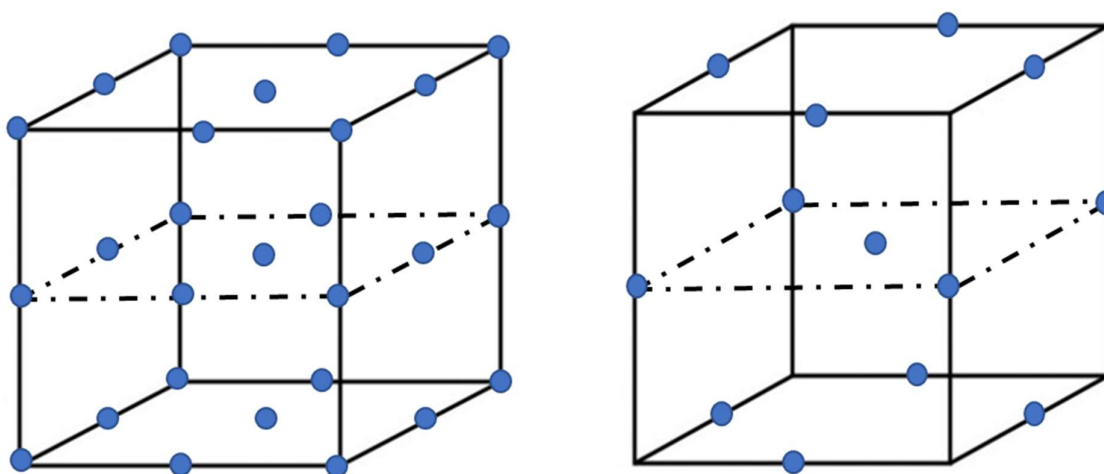


Figura 4.11 - Representação em três dimensões de um planejamento de três níveis: completo com 27 experimentos (esquerda); e Box-Behnken com 13 experimentos (direita).

O método desenvolvido por Box e Behnken (1960) orienta os experimentos para avaliar o efeito das variáveis na concentração de cafeína extraída, através de três níveis de três variáveis. Os três níveis de vazão de CO_2 estudados foram 700, 950 e 1200 g/h; os níveis de vazão de etanol foram 50, 78, 106 g/h ; e os níveis de tempo de extração foram 2,0, 3,5 e 5,0 h. Os demais parâmetros da extração foram mantidos constantes: 300 bar, 60 °C, 140 g de erva-mate de diâmetro de partícula média de 0,427 mm. No total, pelo planejamento experimental de Box-Behnken, foram realizadas 15 extrações nas condições apresentadas na Tabela 4.5 com as variáveis independentes codificadas.

Tabela 4.5 – Planejamento experimental Box-Behnken para as variáveis independentes para extração de cafeína das folhas de erva-mate sapecadas por fluido supercrítico.

Exp.	Variáveis dependentes descodificadas			Variáveis dependentes codificadas		
	Vazão de CO ₂ (g/h)	Vazão de etanol (g/h)	Tempo (h)	X ₁	X ₂	X ₃
1	950	78	3.5	0	0	0
2	700	106	3.5	-1	1	0
3	1200	50	3.5	1	-1	0
4	700	50	3.5	-1	-1	0
5	950	78	3.5	0	0	0
6	950	106	2.0	0	1	-1
7	1200	78	2.0	1	0	-1
8	700	78	2.0	-1	0	-1
9	700	78	5.0	-1	0	1
10	1200	106	3.5	1	1	0
11	1200	78	5.0	1	0	1
12	950	50	5.0	0	-1	1
13	950	50	2.0	0	-1	-1
14	950	78	3.5	0	0	0
15	950	106	5.0	0	1	1

X_1 é a vazão de CO₂, X_2 é a vazão de etanol e X_3 é o tempo.

No fim da extração, 2 g de erva-mate processada foram coletados e usados nas análises do teor de cafeína. A análise foi realizada por CLAE e o procedimento foi feito em duplicata. Com os resultados obtidos a partir dos experimentos definidos pelo planejamento Box-Behnken, obteve-se uma equação polinomial de segunda ordem (Equação 4.7) que relaciona as variáveis independentes com a concentração de cafeína, utilizando *software Statistica 10*®.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (4.7)$$

onde, Y é a resposta predita; X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis independentes; β_0 é uma constante; $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ são os coeficientes lineares; $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ são o coeficiente de interação entre os fatores; e $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ são os coeficientes quadráticos.

Utilizando-se a Equação 4.7 é possível obter a condição otimizada para a remoção de cafeína de folhas de erva-mate. Para a otimização, considera-se a condição em que obtêm erva-mate descafeinada (teor de cafeína $\leq 0,1\%$). Nesta condição otimizada, realizaram-se extrações em triplicata a fim de verificar-se a aderência dos resultados do planejamento experimental com os valores obtidos experimentalmente.

4.2.2.3. Modelagem matemática da extração supercrítica

Na condição otimizada para a obtenção de erva-mate descafeinada foram realizados experimentos para obter a curva de extração rendimento *versus* tempo, tanto em relação à cafeína extraída como em relação à quantidade total de extrato. A quantidade de cafeína foi determinada por CLAE, solubilizando o extrato seco em água, enquanto o extrato total foi medido sua massa em balança analítica. As extrações nesta condição otimizada foram realizadas em triplicata.

A representação matemática das curvas de extração, para ajustar os dados experimentais e obter os parâmetros de transferência de massa, é baseado no modelo matemático desenvolvido por Reverchon (1997). O modelo consiste em um balanço de massa unidimensional para o extrato (pseudo-componente). O balanço de massa é dado pelas Equações 4.8 e 4.9.

Balanço de massa da fase fluida:

$$\frac{\partial C(z, t)}{\partial t} = -v \frac{\partial C(z, t)}{\partial z} - \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \rho_s \frac{\partial q(z, t)}{\partial t} \quad (4.8)$$

Balço de massa da fase s3lida:

$$\frac{\partial q(z, t)}{\partial t} = -k_{TM}[q(z, t) - K \cdot C(z, t)] \quad (4.9)$$

onde $C(z, t)$ 3 a concentra33o do extrato na fase vapor; $q(z, t)$ 3 a concentra33o de extrato na erva-mate; v 3 a velocidade intersticial do fluido; ε 3 a porosidade do leito; k_{TM} 3 o coeficiente interno de transfer3ncia de massa; ρ_s 3 a massa espec3fica da erva-mate e K 3 constante de equil3brio entre as fases.

O modelo tamb3m consiste nas condi33es inicial e de contorno: $q(z, 0) = q_0$ e $C(z, 0) = 0$, q_0 3 definida pela quantidade total de extrato existente na fase s3lida e $C(z, 0) = 0$ como condi33o de contorno. O comportamento linear para a fase s3lido-fluido 3 expresso por $q^*(z, t) = K \cdot C(z, t)$ (Almeida et al., 2013; Falc3o et al., 2017; Rossa et al., 2018)

O sistema de equa33es diferenciais parciais 3 resolvido numericamente usando o simulador din3mico EMSO (Ambiente para Modelagem, Simula33o e Otimiza33o), que 3 um simulador adequado para simula33es din3micas (Soares e Secchi, 2003). O coeficiente de transfer3ncia de massa interna k_{TM} e a constante de equil3brio K foram estimados pelo m3todo dos m3nimos quadrados e a fun33o objetivo minimizada pelo algoritmo de Nelder-Mead (1965).

4.2.2.4. An3lise de cafe3na na erva-mate

O procedimento usado para determinar a concentra33o de cafe3na nas folhas de erva-mate inicia com a decoc33o aquosa (Filip et al., 1998) do material vegetal para remover a cafe3na das folhas atrav3s da solubiliza33o da cafe3na na fase aquosa. Este procedimento foi realizado utilizando 200 mL de 3gua MiliQ em ebuli33o e 2 g de folhas de erva-mate por 20 min. Depois de arrefecer, a mistura foi filtrada e analisada por CLAE (4.1.2.3. An3lise de cafe3na). Este procedimento foi realizado para a erva-mate antes e depois do processo de extra33o em duplicata.

4.2.2.5. *Análise da capacidade antioxidante da erva-mate após o processo de extração por fluido supercrítico*

Para avaliar o impacto do processo de extração de cafeína na capacidade antioxidante da erva-mate, foram realizados extratos de infusão de erva-mate antes e após a extração supercrítica na condição otimizada. A infusão foi realizada com 7 g de erva-mate e 70 mL de água MiliQ (100 mg de erva-mate/mL) por 6 horas a 60 °C; em seguida, uma amostra foi coletada filtrada e diluída (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,00; 2,00 mg de erva-mate/ml). A capacidade antioxidante foi determinada pela metodologia DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (item 4.1.2.4. Análise Antioxidante). A capacidade antioxidante foi calculada usando a Equação 4.10 como um percentual da concentração inicial (60 µM).

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{(\text{Abs} * 100)}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \quad (4.10)$$

Os experimentos foram feitos em triplicata e um teste F foi realizado para detectar diferenças significativas entre os valores das diferentes amostras. Além disso, as médias e os desvios padrões foram calculados, e as médias foram consideradas significativamente diferentes quando os valores de p foram inferiores a 0,1.

4.2.2.6. *Avaliação da quantidade de cafeína ingerida no chimarrão*

4.2.2.6.1 Procedimento experimental

Para avaliar a influência do processo de extração de cafeína realizado na quantidade de cafeína ingerida, foram realizados experimentos simulando a preparação do chimarrão com amostras de erva-mate antes e depois do processo de extração por fluido supercrítico. Este processo ajuda a esclarecer o impacto da extração proposta frente a quantidade de cafeína que será ingerida pelo consumidor final, já que o processo simula com grande semelhança o modo de preparo utilizado pela maioria dos consumidores. A metodologia realizada baseia-se na proposta

apresentada por Meinhart et al. (2010), onde utiliza-se um *trap* acoplado a uma bomba de vácuo para fazer a sucção e a amostragem da bebida, preparada em sua forma tradicional em uma cuia. A Figura 4.12 apresenta de forma esquemática a o sistema descrito.

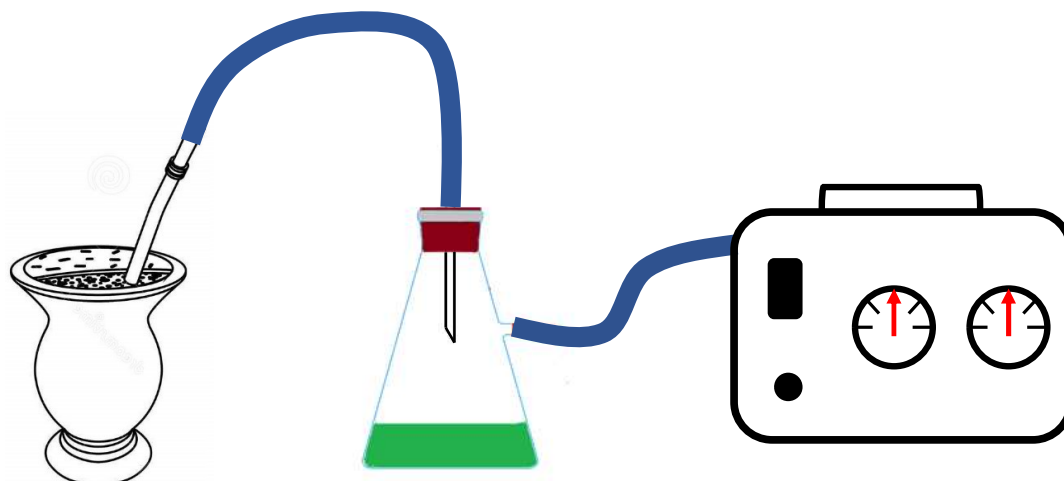


Figura 4.12 Representação esquemática do processo utilizado para simular a quantidade de cafeína obtida a cada servida; constituído por uma cuia e um *trap* acoplado a uma bomba de vácuo

Os experimentos realizados foram iguais para os dois tipos de erva-mate, sendo feitos em duplicata e com 40 g de material de vegetal dispostos no interior da cuia. Para a primeira servida de água deionizada foi utilizado 164 mL, volume necessário para preencher o restante da cuia. As demais servidas foram de $65,5 \pm 2,2$ mL e a temperatura da água era de $74,9 \pm 0,9$ °C. Ao todo foram realizados 30 processos de servidas, a fim de esgotar a erva-mate, e foram realizadas coletas para análise de cafeína nas seguintes servidas: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 14, 18, 22, 26 e 30. Em cada uma das servidas o tempo de contato entre a água quente e a erva-mate foi de 30 s, com um intervalo de 2 min entre cada servida. O volume de água coletada em cada servida foi medido e uma alíquota foi filtrada e analisada em CLAE seguindo a mesma metodologia apresentada anteriormente (4.1.2.3. Análise de cafeína).

4.2.2.6.2 Modelagem matemática

Uma modelagem matemática do processo extrativo que ocorre durante o preparo do chimarrão foi proposta para ajustar os dados experimentais e obter os

parâmetros de transferência de massa. O modelo matemático utilizado é baseado no modelo desenvolvido por Reverchon (1997), um balanço de massa para o extrato (pseudo-componente) nas fases fluida e sólida, porém, para adequar-se às peculiaridades deste processo, foi utilizada a equação onde não há variação de concentração da fase fluida ao longo do leito. O balanço de massa é dado pelas Equações 4.11 e 4.12.

Balanço de massa da fase fluida:

$$\left(\frac{W}{\rho}\right)C + \varepsilon V \frac{dC}{dt} + (1 - \varepsilon) V \frac{dq}{dt} = 0 \quad (4.11)$$

Balanço de massa da fase sólida:

$$\frac{dq}{dt} = k_{TM} (q - q^*) \quad (4.12)$$

onde W é a taxa mássica de solvente; ρ é a densidade do solvente; V é o volume da cuia; C é a concentração do extrato na fase fluida; q é a concentração de extrato na erva-mate; ε é a porosidade do leito; k_{TM} é o coeficiente interno de transferência de massa.

O comportamento linear para a interface sólido-fluido é expresso por $q^* = K \cdot C$, sendo K o coeficiente partição. Por sua vez, a taxa mássica de solvente foi determinada pelo total de água utilizada (2,025 kg) pelo tempo total (900 s) em que o solvente entrou em contato com a erva-mate, com a densidade do solvente de 0,9748 kg/m³.

O sistema de equações diferenciais parciais é resolvido numericamente usando o simulador dinâmico EMSO, que é um simulador adequado para simulações dinâmicas (Soares e Secchi, 2003). O coeficiente de transferência de massa interna k_{TM} e a constante de equilíbrio K foram estimados pelo método dos mínimos quadrados e a função objetivo minimizada pelo algoritmo de Nelder-Mead (1965).

4.2.2.7. *Análise e purificação do extrato*

4.2.2.7.1 Tratamento inicial do extrato

Os extratos obtidos nas extrações da Etapa 3 foram coletados e misturados para a realização das análises de determinação do teor de cafeína e de atividade antioxidante. Inicialmente, o extrato se apresentava solubilizado em etanol no frasco coletor, já que após a despressurização o CO₂ torna-se gasoso. Esta solução (extrato+etanol) foi filtrada em papel filtro para eliminar o excesso de cera não solubilizada. Após a filtração, o etanol foi removido em um evaporador rotativo, sob vácuo. Com isso, obteve-se o extrato sólido do processo de extração supercrítica e foram determinadas a concentração de cafeína e a atividade antioxidante do mesmo.

Para a determinação da concentração de cafeína, o extrato sólido foi dissolvido em água MilliQ e 10 µL de amostra foi injetada no CLAE (4.1.2.3. Análise de cafeína). Os ensaios foram realizados em duplicata. Por sua vez, a determinação da atividade antioxidante foi utilizado o método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) apresentada no item 4.1.2.4. Análise Antioxidante, e os ensaios foram realizados em duplicata.

4.2.2.7.2 Planejamento experimental da purificação do extrato

Após a obtenção do extrato sólido, descrito no item 4.2.2.7.1, foi proposto um planejamento experimental para aumentar a concentração de cafeína no extrato. O procedimento foi realizado em um Becker, onde o extrato sólido foi adicionado juntamente com 100 mL de água deionizada, sob agitação por 20 min. Devido a boa solubilidade da cafeína em água, há a transferência de massa da fase sólida (extrato) para a fase líquida (água); por outro lado, a cera ainda remanescente no extrato possui baixa solubilidade em água, e assim, são separados da cafeína.

As variáveis independentes avaliadas no planejamento experimental de dois níveis e dois fatores foi a concentração de extrato sólido por volume de água e a temperatura da água. Na Tabela 4.6 são apresentados os 7 experimentos realizados, incluindo a triplicata no ponto central. Após os 20 min do experimento, o sistema foi filtrado em papel filtro para separação dos sólidos não solubilizados e em seguida a

fase aquosa foi seca em evaporador rotativo. Assim, o extrato purificado e seco foi pesado em balança analítica e resolubilizado em concentração conhecida para análise em CLAE, conforme metodologia apresentada na item 4.1.2.3. Análise de cafeína.

Tabela 4.6 – Planejamento experimental 2² para as variáveis independentes para purificação do extrato seco obtido pela extração por fluido supercrítico.

Experimento	Variáveis dependentes descodificadas		Variáveis dependentes codificadas	
	Concentração de extrato (mg/ml)	Temperatura (°C)	X ₁	X ₂
1	16	25	-1	-1
2	54	25	1	-1
3	54	45	1	1
4	16	45	-1	1
5	35	35	0	0
6	35	35	0	0
7	35	35	0	0

X₁ é a concentração, X₂ é a temperatura

A partir dos resultados obtidos do planejamento fatorial foi ajustada uma equação polinomial do mesmo formato da Equação 4.6, utilizando *software Statistica 10*® para relacionar as variáveis independentes e a concentração de cafeína no extrato após a purificação.

4.2.3. Resultados e discussões

Considerou-se erva-mate descafeinada aquela que possui concentração de cafeína menor ou igual a 0,1% ($\frac{g_{\text{cafeína}}}{g_{\text{erva-mate}}}$), visto que este é o valor considerado pela ANVISA (2005) para classificar um produto como sendo descafeinado.

4.2.3.1. Etapa 1 – Avaliação do tempo

Os resultados obtidos no processo de extração de cafeína das folhas de erva-mate, quando se avaliou apenas o tempo como variável, são apresentados na Tabela 4.7. A concentração inicial de cafeína era de 2,1% ($\text{g}_{\text{cafeína}}/\text{g}_{\text{erva-mate}}$).

Tabela 4.7 - Resultado da avaliação do tempo (Etapa 1) no processo de extração de cafeína por fluido supercrítico das folhas de erva-mate (EM).

Tempo (h)	Concentração de Cafeína na EM processada (%)	Cafeína Extraída (%)
0,0	2,099	0,00
4,0	0,464	77,89
5,0	0,284	86,45
6,5	0,121	94,24
8,5	0,092	95,63

Estes dados mostram que no período inicial o processo tem uma maior capacidade de reduzir o teor de cafeína na erva-mate. À medida que a concentração de cafeína na folha diminuiu, o avanço do processo de extração também diminuiu. Nas condições operacionais estudadas, obteve-se que o tempo necessário para se obter erva-mate descafeinada foi de 8,5 h. O experimento foi realizado sem repetição, já que o objetivo foi avaliar o efeito do tempo na remoção da cafeína, visto que houve um aumento de massa de erva-mate utilizada em relação a estudos realizados previamente por Franceschini (2017).

4.2.3.2. Etapa 2 – Planejamento experimental por fatorial 2²

Na Tabela 4.8 são apresentados os resultados de concentração de cafeína na erva-mate processada para as 07 extrações realizadas, levando em conta o planejamento experimental fatorial 2² com triplicata no ponto central, onde as variáveis controladas foram a vazão de CO₂ e a razão de etanol (m/m). Com os dados obtidos para a concentração de cafeína foi ajustada uma equação polinomial de segunda ordem, utilizando *software Statistica 10*® (Equação 4.13). A partir desta equação é

possível relacionar diretamente a concentração de cafeína nas folhas de erva-mate após o processamento com as variáveis independentes (vazão de CO₂ e razão de etanol), dentro do intervalo estudado. A equação apresentada é referente aos valores codificados (-1 para a condição mínima, 0 para a condição média e 1 para a condição de máximo) das variáveis independentes e o coeficiente de determinação (R²) obtido foi de 0,983.

Tabela 4.8 - Resultados do planejamento de experimento por fatorial 2² (Etapa 2) no processo de extração de cafeína por fluido supercrítico das folhas de erva-mate (EM).

Experimento	Vazão de CO ₂	Razão de etanol	Concentração de cafeína na EM processada (g caf/g EM)
1	-1	-1	1,352%
2	1	-1	0,967%
3	0	0	0,616%
4	-1	1	0,425%
5	0	0	0,694%
6	1	1	0,042%
7	0	0	0,505%

$$Y = 0,006965 - 0,00192 * X_1 - 0,00463 * X_2 + 0,000005 * X_1 * X_2 \quad (4.13)$$

onde Y é a concentração de cafeína na erva-mate (g caf/g EM); X₁ é a vazão de CO₂; e X₂ é a razão de etanol.

De posse dos resultados experimentais é possível observar a influência da vazão de CO₂, mas também da razão de etanol, já que quanto menores seus valores, menos efetiva foi a extração de cafeína. Contudo, a razão de modificador, proporção da vazão de etanol em relação à vazão de CO₂, apresenta uma maior influência dentro dos limites estudados, isto pode ser observado ao comparar os experimentos 2 e 4 (combinações de valores máximos e mínimos). Ao utilizar o valor máximo da razão de etanol do solvente combinado com o mínimo de CO₂ obteve-se menores valores de concentração de cafeína do que se utilizando o valor máximo de CO₂ e mínimo de

modificador. Este comportamento também pode ser observado na Equação 4.13, já que o coeficiente da razão de etanol (0,00463) é 2,41 vezes maior do que o coeficiente da vazão de etanol (0,00192). Apenas para o experimento 6, quando são utilizados para ambas as variáveis os valores máximos, foi possível obter erva-mate descafeinada, segundo os critérios da ANVISA.

Além disto, foi gerado um gráfico de resposta de superfície (Figura 4.13), que é a representação gráfica de uma variável resposta em função de um ou mais fatores do processo. A superfície de resposta, que facilita a visualização do comportamento da concentração de cafeína nas folhas de erva-mate dentro dos limites estudados, foi obtida utilizando o *software Statistica 10*® através da equação 4.13.

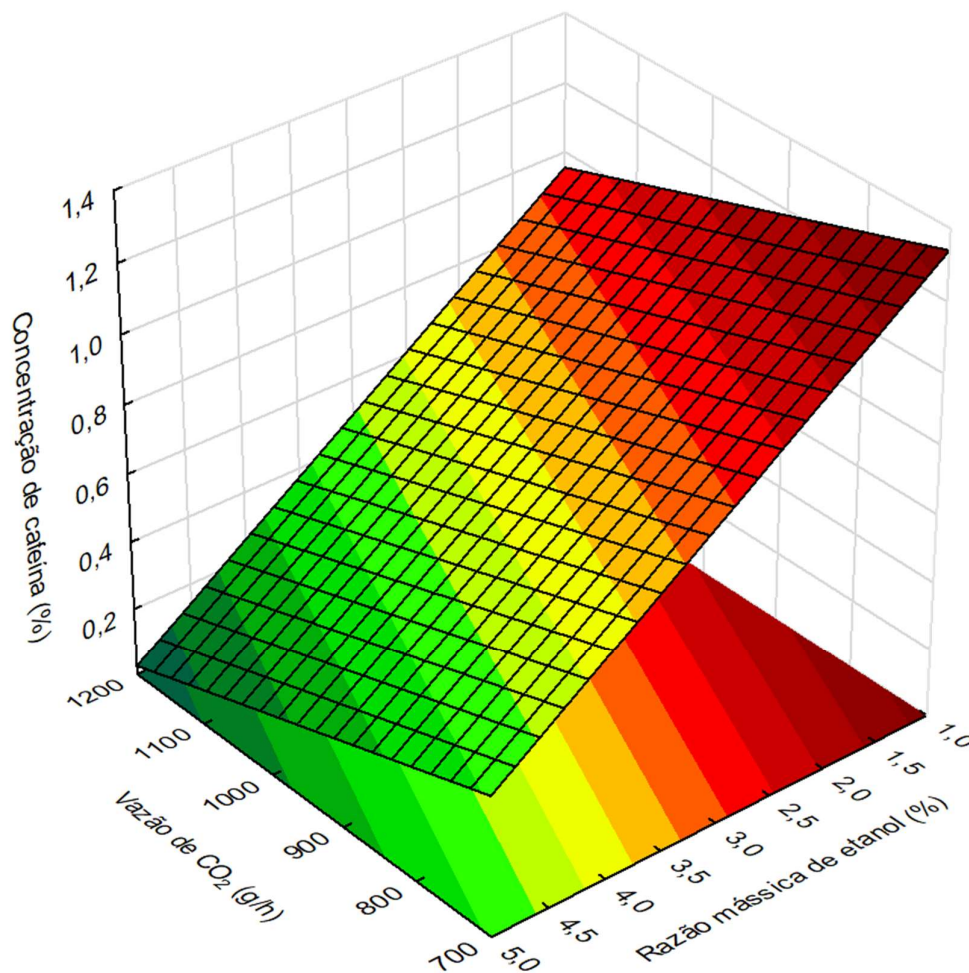


Figura 4.13 - Superfície de resposta de concentração de cafeína (% g caf/g EM) para vazão de CO₂ versus razão de etanol (modificador) para o processo de extração de cafeína por fluido supercrítico das folhas de erva-mate.

Ao analisar a Figura 4.13 é possível visualizar a dependência da concentração de cafeína na erva-mate após a extração com a vazão de CO₂, bem como a razão mássica de etanol. Ao passo que as variáveis independentes aumentam a concentração de cafeína diminui, portanto apenas na região próxima à condição de máximos seria possível obter erva-mate com concentrações inferiores a 0,1% de cafeína.

4.2.3.3. Etapa 3 - Planejamento experimental por Box-Behnken

Os resultados de concentração de cafeína na erva-mate processada para cada condição de extração supercrítica definida no planejamento experimental Box-Behnken são apresentados na Tabela 4.9. A concentração inicial de cafeína nas folhas de erva-mate foi de 2,1% (g_{cafeína}/g_{erva-mate}). As três variáveis independentes controladas (vazão de CO₂, vazão de etanol e tempo de extração) contribuíram para reduzir o teor de cafeína nas folhas de erva-mate, já que manipulando seus níveis foi possível aumentar a extração de cafeína.

Tabela 4.9 - Resultados do planejamento de experimento por Box-Behnken (Etapa 3) no processo de extração de cafeína por fluido supercrítico das folhas de erva-mate (EM).

Experimento	Vazão de CO ₂	Vazão de etanol	Tempo	Concentração de cafeína (g caf/g EM)
1	0	0	0	0,381%
2	-1	1	0	0,372%
3	1	-1	0	0,422%
4	-1	-1	0	0,751%
5	0	0	0	0,299%
6	0	1	-1	0,483%
7	1	0	-1	0,710%
8	-1	0	-1	0,828%
9	-1	0	1	0,202%
10	1	1	0	0,233%
11	1	0	1	0,030%
12	0	-1	1	0,355%
13	0	-1	-1	0,576%
14	0	0	0	0,425%
15	0	1	1	0,050%

Ao comparar-se os experimentos 8 e 11, maior e menor concentração de cafeína na erva-mate processada, respectivamente, foi possível reduzir 26,6 vezes a concentração de cafeína na erva-mate. No entanto, apenas duas condições estudadas (experimentos 11 e 15) foram capazes de atingir concentrações de cafeína inferiores a 0,1%.

Com os resultados experimentais obtidos nas extrações por fluido supercrítico do planejamento experimental Box-Behnken, foi ajustada uma equação polinomial de segunda ordem, utilizando *software Statistica 10*® (Equação 4.14). A equação apresentada é referente aos valores codificados das variáveis independentes e o coeficiente de determinação (R^2) obtido foi de 0,912.

$$\begin{aligned}
 Y = & 3,7 \times 10^{-3} - 9,5 \times 10^{-4}X_1 - 1,2 \times 10^{-3}X_2 - 2,4 \times 10^{-3}X_3 \\
 & + 7,6 \times 10^{-4}X_1^2 - 2,0 \times 10^{-6}X_2^2 - 2,2 \times 10^{-5}X_3^2 \\
 & + 4,7 \times 10^{-4}X_1X_2 - 1,4 \times 10^{-4}X_1X_3 - 5,3 \times 10^{-4}X_2X_3
 \end{aligned} \tag{4.14}$$

onde Y é a concentração de cafeína na erva-mate (g caf/g EM); X_1 é a vazão de CO_2 , X_2 é a vazão de etanol; and X_3 é o tempo de extração.

Os coeficientes lineares apresentaram valores maiores do que os demais coeficientes, sendo o maior coeficiente para o tempo de extração ($2,4 \times 10^{-3}$). Também, fazendo uso da Equação 4.14, foram geradas superfícies de contorno que relaciona a região entre os níveis máximo e mínimo de duas variáveis independentes à terceira variável independente mantida no nível central.

Na Figura 4.14 é possível avaliar a influência das variáveis tempo de extração e vazão de CO_2 ao manter a vazão de etanol constante no nível central (78 g/h). Aumentar a vazão de CO_2 para valores superiores ao nível central (950 g/h) não contribui para reduzir a concentração de cafeína na erva-mate processada, principalmente quando o tempo de extração é maior. Por sua vez, a variável tempo de extração apresentou um comportamento regular dentro dos limites avaliados, com diminuição da concentração de cafeína na erva-mate processada à medida que o

tempo de extração aumenta. A única região (Figura 4.14) que representa um processo no qual se obteria erva-mate com teores de cafeína iguais ou menores do que 0,1% na erva-mate processada é a extremidade inferior esquerda.

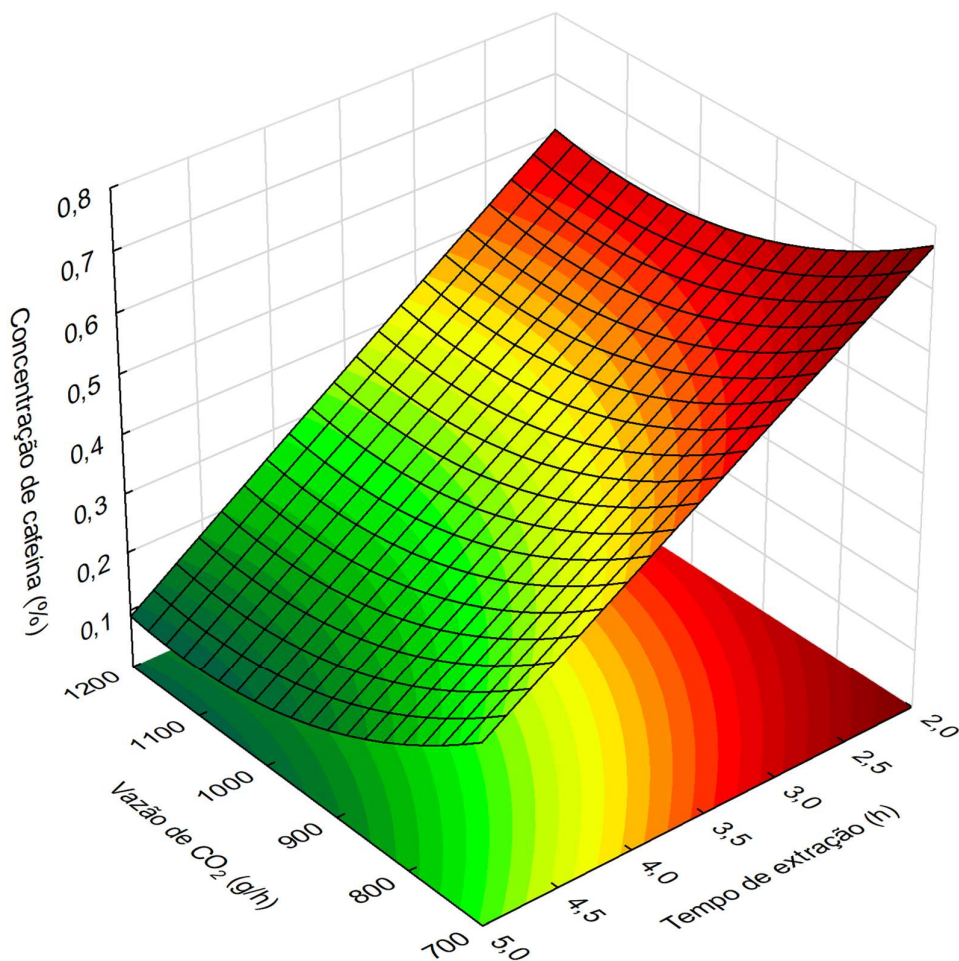


Figura 4.14 - Superfície de resposta da concentração de cafeína nas folhas de erva-mate processada (% g caf/g EM): tempo de extração *versus* vazão de CO₂, com vazão de etanol fixado no nível médio

Na Figura 4.15 é possível avaliar a influência das variáveis tempo de extração e vazão de etanol ao manter a vazão de CO₂ constante no nível central (950 g/h). Verifica-se que ambas variáveis independentes possuem influência no processo de extração de cafeína das folhas de erva-mate. Ao aumentar os valores de tempo de extração ou vazão de etanol há uma redução da concentração de cafeína na erva-mate processada. A Figura 4.15 mostra uma região onde seria possível obter erva-mate processada com valores iguais ou menores do que 0,1%. Esta região compreende entre vazão de etanol aproximadamente 0,2 (83 g/h) para o tempo de

extração máximo (5 h); e o outro extremo para um tempo de extração aproximado de 0,7 (4,85 h) e vazão de etanol máxima (105 g/h). Há uma área na Figura 4.15 em que a curva de nível calculada representa um valor da concentração de cafeína menor que zero. Fisicamente este valor não é possível, denotando ali ser uma região onde não há mais a presença de cafeína nas folhas de erva-mate.

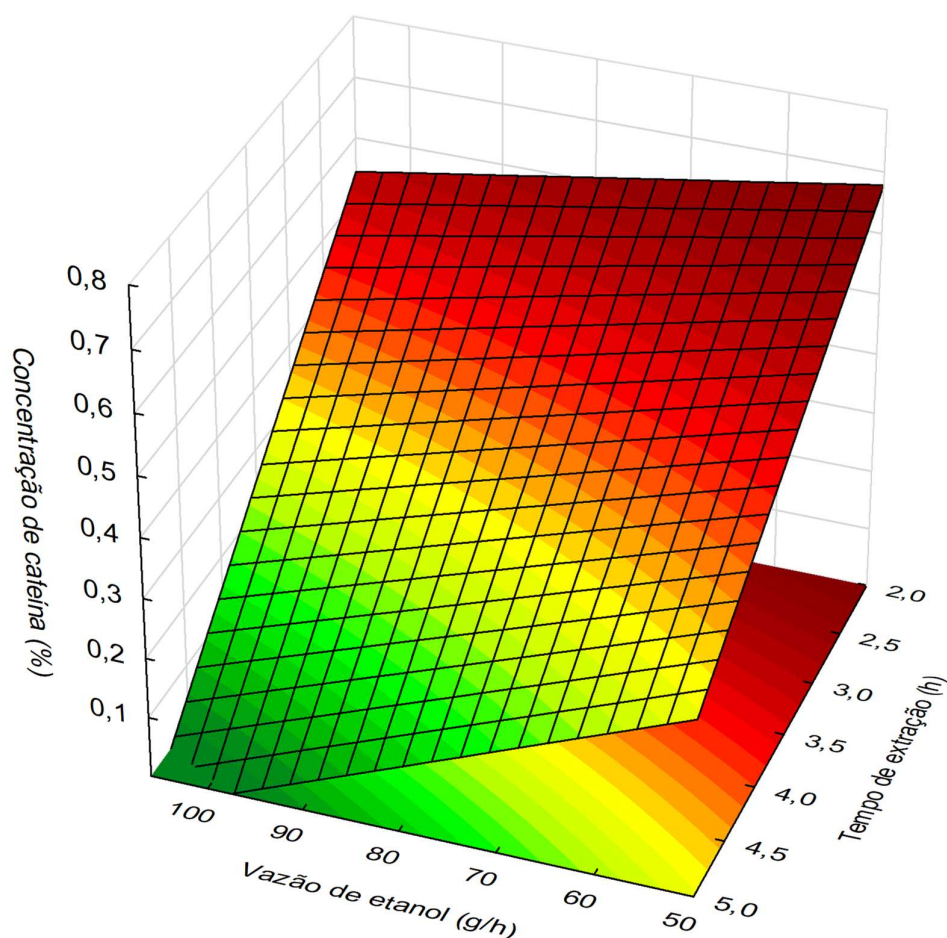


Figura 4.15 – Superfície de resposta da concentração de cafeína nas folhas de erva-mate processada (% g caf/g EM): tempo de extração versus vazão de etanol, com vazão de CO₂ fixado no nível médio

Por fim, na Figura 4.16 é possível avaliar a influência das variáveis vazão de CO₂ e vazão de etanol ao manter o tempo de extração constante no nível central (3,5 h). Verifica-se uma maior influência da vazão de etanol frente a vazão de CO₂, visto que apenas com valores mais elevados de vazão de etanol é possível obter os menores valores de concentração de cafeína na erva-mate processada. Para valores maiores de vazão de CO₂ não houve redução da concentração de cafeína. Com o

tempo de extração fixado em seu valor médio (3,5 h), não é possível obter erva-mate com teor de cafeína igual ou menor do que 0,1%.

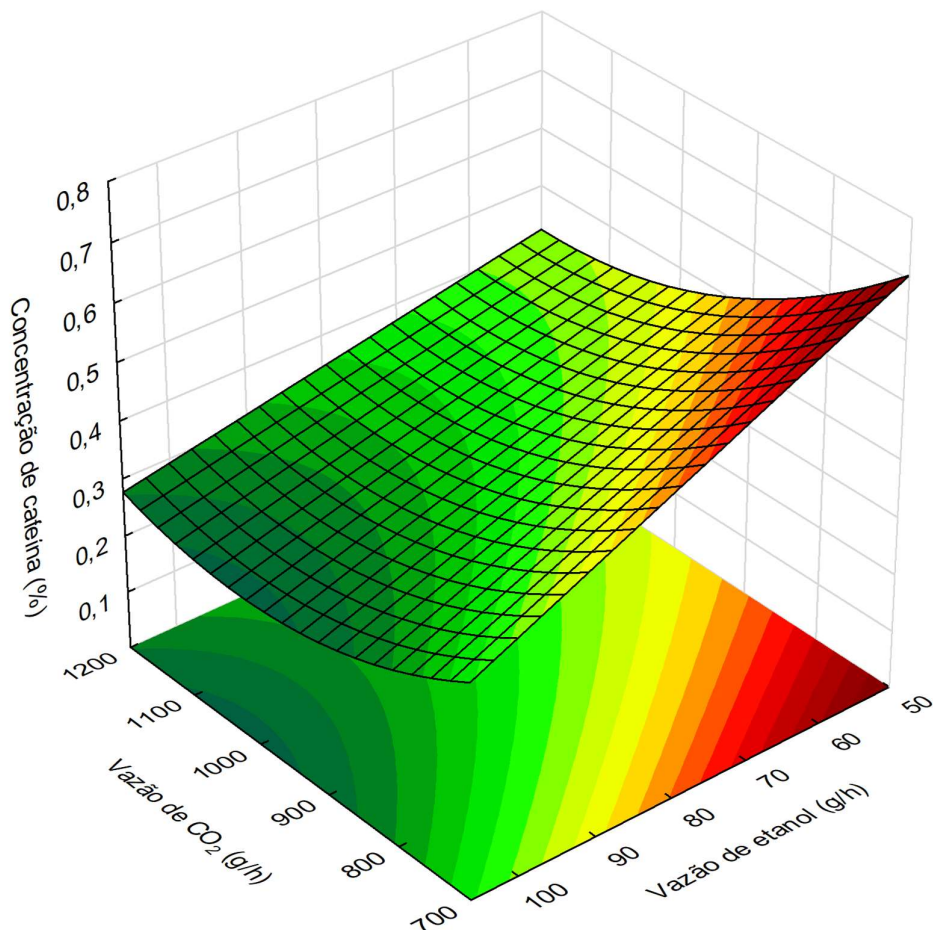


Figura 4.16 - Superfície de resposta da concentração de cafeína nas folhas de erva-mate processada (% g caf/g EM): vazão de etanol *versus* vazão de CO₂, com tempo de extração fixado no nível médio

Ao analisar conjuntamente as superfícies de respostas, pode-se verificar que somente é possível obter erva-mate descafeinada para valores de tempo maiores que 3,5 h (nível médio), enquanto, para as outras duas variáveis, foi possível obter erva-mate descafeinada, mesmo para valores médios das respectivas variáveis. Também há uma alta dependência da vazão de etanol na diminuição da concentração de cafeína na erva-mate. Usando o etanol, a polaridade da mistura de solventes foi alterada, o que favoreceu a remoção de cafeína. Etanol foi escolhido em vez de água como modificador, para mudar a polaridade, porque o primeiro tem uma maior solubilidade em CO₂ em comparação com o último (Gupta e Shim, 2007; Park et al., 2007).

Utilizando a Equação 4.9 é possível obter uma condição otimizada para a obtenção de erva-mate descafeinada. A solução encontrada para equação, quando se busca um valor de concentração de cafeína (Y) menor ou igual a 0,1%, retorna valores para $X_1 = 0$, $X_2 = +1$ e $X_3 = 0,5$. Descodificando os valores encontramos que a vazão de CO_2 (X_1) é 950 g/h, vazão de etanol (X_2) é 106 g/h e tempo (X_3) é 4,25 h. A condição otimizada apresenta um tempo de extração inferior ao obtido por Saldaña et al. (1999), mesmo utilizando 140 g de erva-mate, frente aos 10 g utilizadas pelo autor durante um processo de extração por fluido supercrítico de 7 h.

Os experimentos em triplicata na condição ótima resultaram em uma erva-mate processada com concentração de cafeína de $0,163\% \pm 0,058\%$. O valor obtido é superior ao teórico (0,1%) devido ao erro experimental associado ao processo, porém foi utilizado um lote de erva-mate diferente do que foi gerado o modelo, demonstrando a qualidade e confiabilidade nos dados gerados pelo planejamento experimental. Também é importante ressaltar que o valor obtido é para a folha de erva-mate e que o produto comercializado é uma mistura de folhas e galhos (palitos) de erva-mate. Estes palitos possuem concentração menor de cafeína e, conforme apontado o estudo de Franceschini (2017), é possível obter concentrações de cafeína de 0,076% nos palitos após a extração supercrítica. Portanto, ao adicionar os palitos às folhas de erva-mate haverá uma diminuição na concentração total de cafeína.

Na Tabela 4.10 são apresentados os valores obtidos na triplicata, bem como o desvio obtido, para as massas de extrato e de cafeína para os experimentos em triplicata na condição otimizada. Foram encontrados valores ao término da extração de 4,25 h de $7,98 \pm 0,17\text{g}$ de extrato total e de $653,4 \pm 59,2$ mg de cafeína.

Tabela 4.10 – Massas de extrato e cafeína ao longo do processo de extração por fluido supercrítico na condição otimizada (950 g/h de CO₂, 106 g/h de etanol e 4,25 h) das folhas de erva-mate.

t (min)	massa de extrato (g)	massa de cafeína (mg)
0	0,00	0,00
20	0,92 ± 0,13	18,11 ± 12,79
40	2,68 ± 0,47	78,46 ± 11,40
60	3,71 ± 0,52	136,72 ± 17,24
80	4,63 ± 0,48	213,28 ± 30,24
100	5,31 ± 0,45	288,21 ± 37,59
120	5,90 ± 0,40	360,75 ± 39,97
140	6,33 ± 0,39	411,48 ± 41,49
160	6,70 ± 0,35	455,88 ± 40,02
180	7,02 ± 0,28	504,29 ± 47,08
200	7,27 ± 0,22	541,19 ± 47,73
220	7,54 ± 0,23	581,20 ± 56,99
240	7,78 ± 0,19	615,03 ± 60,17
260	7,98 ± 0,17	653,41 ± 59,17

Todos os dados apresentam média ± desvio padrão.

4.2.3.4. Modelagem matemática

Para as condições otimizadas definidas a partir da Equação 4.9, 950 g/h de CO₂, 106 g/h de etanol e 4,25 h de extração, foram geradas as curvas de extração massa total de extrato *versus* tempo e massa de cafeína *versus* tempo em triplicata. A partir destes resultados experimentais, ajustaram-se os parâmetros coeficiente de transferência de massa (k_{TM}) e o coeficiente de partição (K) e foram geradas as curvas de extração massa de extrato *versus* tempo (Figura 4.15) e massa de cafeína *versus* tempo (Figura 4.16), aplicando o modelo de Reverchon (1997).

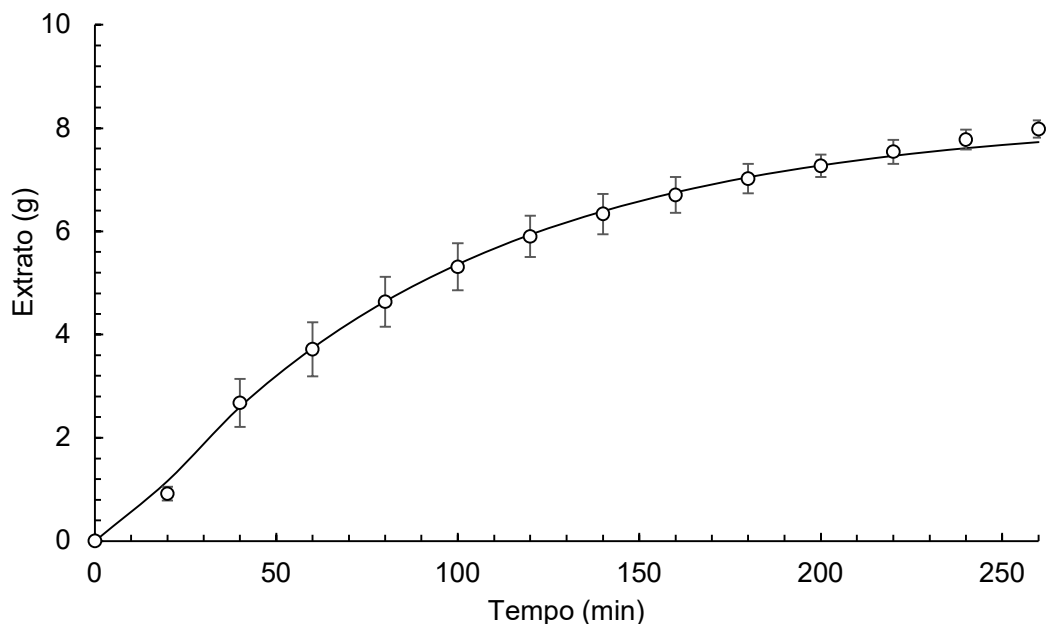


Figura 4.17 – Curva de extração massa de extrato *versus* tempo obtida pelo processo de extração supercrítica a partir das folhas de erva-mate nas seguintes condições experimentais: 950 g/h de CO₂, 106 g/h de etanol e 4,25 h de extração.

Legenda: (o) dados experimentais; (–) modelo matemático proposto por Reverchon (1997).

Para a modelagem que levou em conta a massa de extrato total, o coeficiente de transferência de massa ajustado (k_{TM}) foi $1,925 \times 10^{-4} \pm 0,043 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e o coeficiente de partição (K) foi $9,389 \times 10^{-4} \pm 0,163 \times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{kg}$. O coeficiente de determinação (R^2) para o modelo proposto foi de 0,9983. Por sua vez, o coeficiente de transferência de massa específica de cafeína (k_{TM}^{caf}) foi $8,647 \times 10^{-5} \pm 0,138 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ e seu coeficiente de partição (K^{caf}) is $8,039 \times 10^{-4} \pm 0,112 \times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{kg}$, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9898.

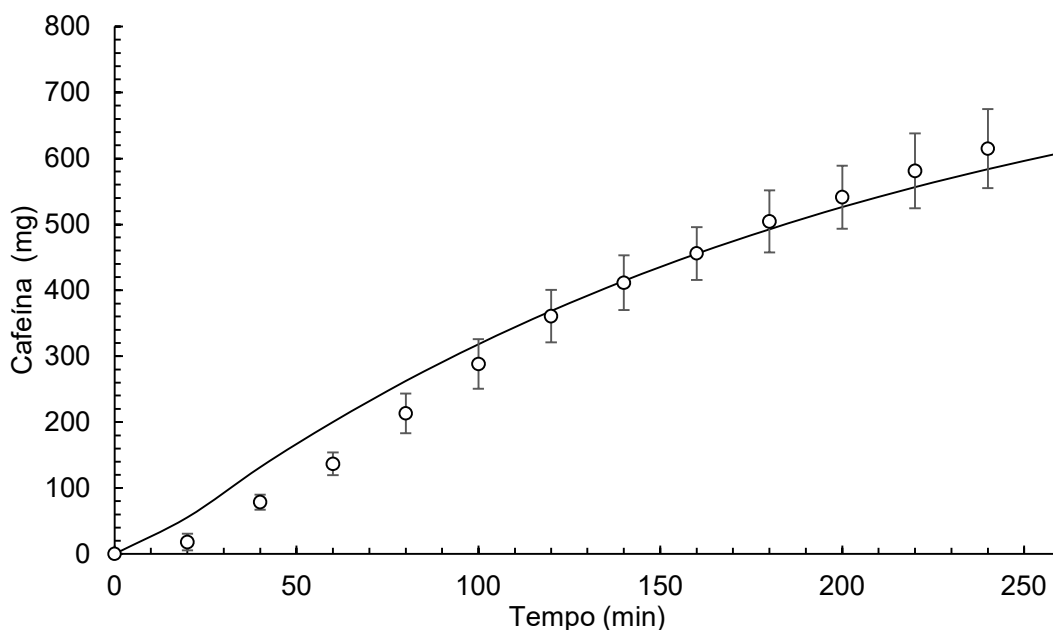


Figura 4.18 – Curva de extração massa de cafeína *versus* tempo obtida pelo processo de extração supercrítica a partir das folhas de erva-mate nas seguintes condições experimentais: 950 g/h de CO₂, 106 g/h de etanol e 4,25 h de extração.

Legenda: (o) dados experimentais; (–) modelo matemático proposto por Reverchon (1997).

Os modelos gerados podem ser uma ferramenta utilizada para prever o tempo necessário para obter o máximo de extrato total e cafeína, ou seja, quando a massa será constante ao longo do tempo. Os parâmetros ajustados se encontram de acordo com outros modelos semelhantes de extração por fluido supercrítico de produtos naturais publicados na literatura. Suas ordens de grandeza são as mesmas apresentadas por Almeida et al. (2013) e Fianco et al. (2018) para a extração da *Hypericum caprifoliatum* e da própolis vermelha, respectivamente.

4.2.3.5. Capacidade antioxidante da erva-mate após o processo de extração por fluido supercrítico

Os resultados das análises da capacidade antioxidantes, utilizando erva-mate não processada e descafeinada, estão apresentados na Figura 4.19. Ao comparar extratos na mesma condição avaliada não foi encontrada diferença significativa, alterando-se o tipo de erva-mate. Ao aumentar a concentração do extrato a capacidade antioxidante também foi aumentada, porém a partir da concentração de

0,75 mg erva-mate/mL entrou-se numa região de máximo, não observado um crescimento na capacidade antioxidante. Isto pode ter acontecido pelo fato de haver quantidade de extrato suficiente para consumir todo, ou quase todo, o DPPH disponível no sistema. Possivelmente, não se obteve resultados maiores do que 95,3%, pelo fato do produto da reação extrato-DPPH e o excesso de extrato possuírem absorvância no comprimento de onda avaliado.

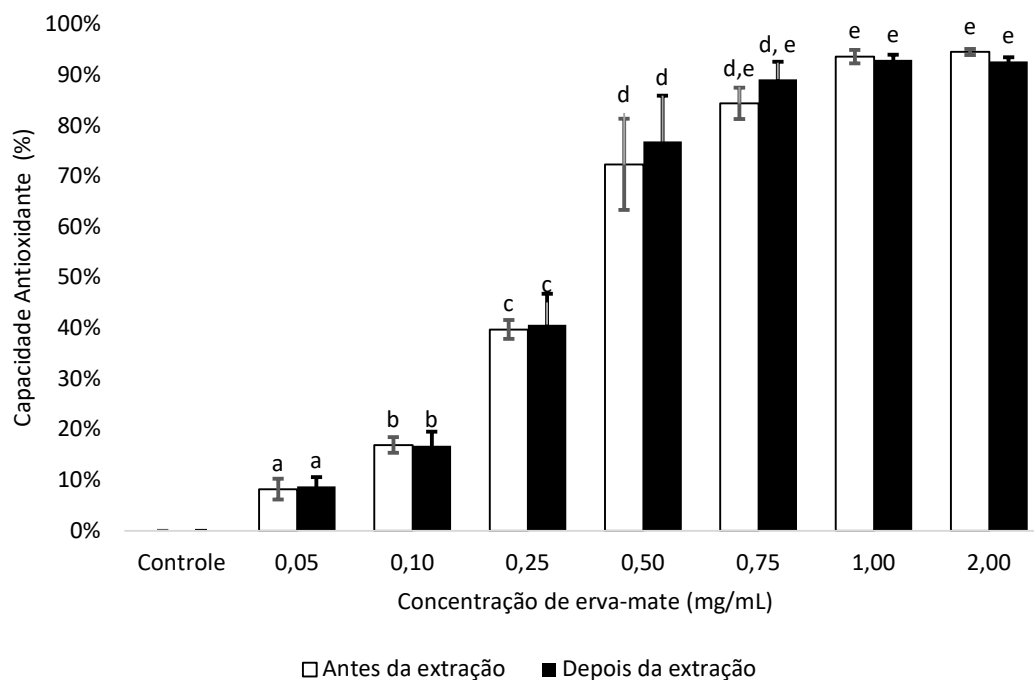


Figura 4.19 – Capacidade antioxidante das diluições (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,00; 2,00) dos extratos aquosos a 60 °C para folhas de erva-mate antes e depois do processo de extração supercrítica. Todos os dados apresentam média \pm desvio padrão. Letras diferentes (a, b, c, d, e) indicam diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,1$).

Estes resultados mostram que a extração por fluido supercrítico foi capaz de reduzir a quantidade de cafeína extraível de folhas de erva-mate por extração aquosa a 60 °C, sem alterar significativamente a capacidade antioxidante. A massa de cafeína obtida, por massa de erva-mate, pela extração aquosa a 60 °C foi de $4,68 \pm 0,03$ mg/g para a erva-mate antes da extração por fluido supercrítico e $0,31 \pm 0,05$ mg/g para a erva-mate após a extração por fluido supercrítico.

4.2.3.6. *Avaliação da quantidade de cafeína ingerida no chimarrão*

Com os dados obtidos das análises de cafeína em cada uma das servidas durante o processo de 30 servidas na cuia foi possível comparar as quantidades de cafeína ingeridas para a erva-mate antes e depois do processo de extração supercrítica. Utilizando a planta antes da extração foi possível obter $388,23 \pm 22,10$ mg de cafeína ao final das 30 servidas água de um total de 440,00 mg de cafeína disponível, ou seja, o processo realizado na cuia foi capaz de disponibilizar ao consumidor 88,2% da cafeína disponível. Já para a erva-mate processada obteve-se $57,71 \pm 6,10$ mg de cafeína ao final de 30 processos de servidas de água de um total de 65,20 mg, disponibilizando 81,9% da cafeína existente na planta. Ao fazer a análise comparativa entre a erva-mate antes e depois do processamento, obtém-se uma redução de ingestão de cafeína de 330,52 mg ou 85,1%.

Na Figura 4.20 é apresentado a massa de cafeína que seria ingerida nas servidas de números: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 14, 18, 22, 26 e 30. Ao analisar a figura é possível observar que ambas curvas possuem um comportamento semelhante na obtenção de cafeína, porém ao utilizar-se a erva-mate antes da extração por fluido supercrítico os valores obtidos são consideravelmente maiores. Por exemplo, na primeira servida da erva-mate antes da extração a massa de cafeína obtida foi de $64,41 \pm 1,07$ mg, sendo este valor, estatisticamente igual ($p > 0,1$) ao somatório de todas as 30 servidas da erva-mate que passou pelo processo de extração supercrítica ($57,71 \pm 6,10$ mg).

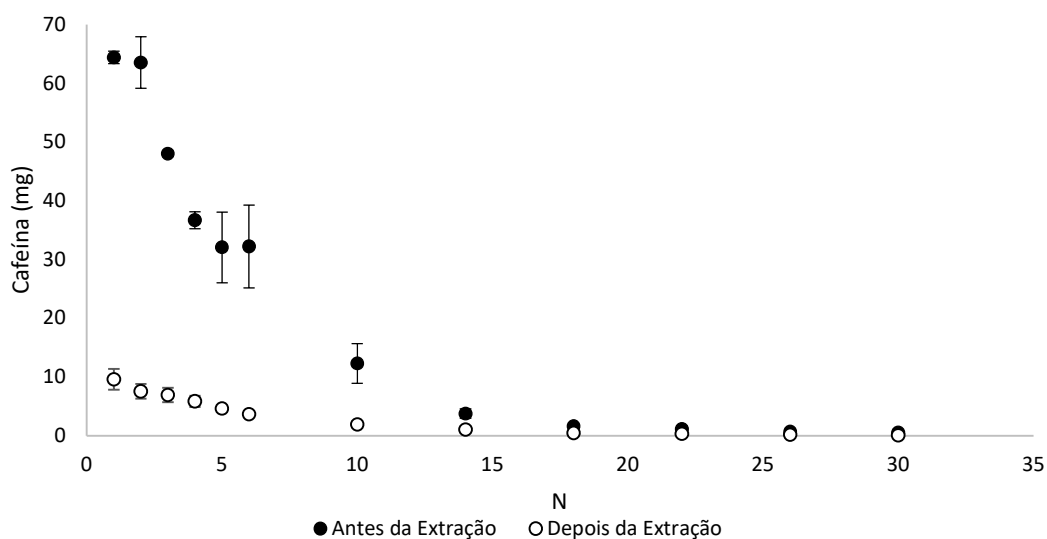


Figura 4.20 Curva de massa de cafeína obtida pontualmente *versus* número de servidas (N) para um processo que simula o método de preparo tradicional do chimarrão utilizando ervamate antes e depois do processo de extração supercrítica.

Legenda: Ervamate antes da extração (●); ervamate depois da extração (○)

Outro ponto a destacar-se da Figura 4.20 é que depois dos seis primeiros pontos é possível visualizar a mudança da dinâmica da extração. Anteriormente a este ponto a extração é regida pela solubilidade da cafeína na água, enquanto depois deste momento é a transferência de massa da cafeína que limita o processo. A partir da servida de número 18 a variação da quantidade de cafeína obtida a cada servida é menor, indicando uma região onde resta somente cafeína em regiões que esta metodologia tem dificuldade em obter. Vale ressaltar que mesmo nesta região, a quantidade de cafeína obtida é estatisticamente diferente ($p < 0,1$) para os dois tipos de ervamate. Por fim, a quantidade de cafeína que seria ingerida na primeira servida de ervamate após o processo de extração, $9,63 \pm 1,78$ mg é compatível com a décima servida da ervamate não processada $12,31 \pm 3,36$ mg.

4.2.3.6.1 Modelagem Matemática

A Figura 4.21 é apresentado a curva de cafeína acumulada ao longo do número de servidas, juntamente com o modelo matemático calculado para a ervamate antes e depois da extração por fluido supercrítico.

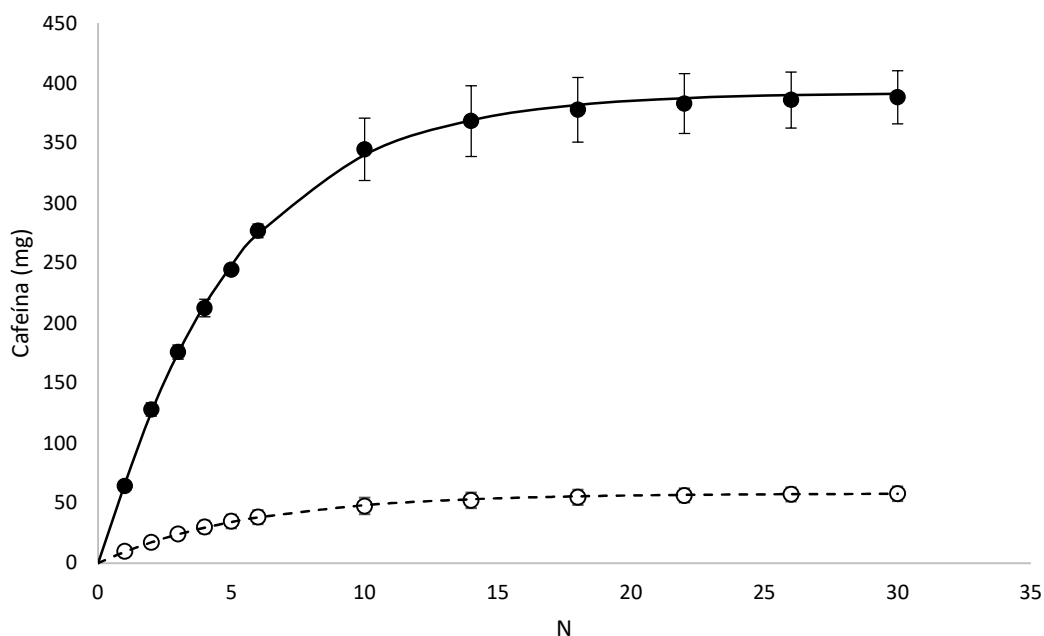


Figura 4.21 - Massa de cafeína *versus* número de servidas no preparo do chimarrão para erva-mate antes e depois da extração por fluido supercrítico.

Legenda: Erva-mate antes da extração (●); erva-mate depois da extração (○); modelagem para erva-mate antes da extração (—); modelagem para erva-mate depois da extração (- - - -).

Os dados obtidos a partir da modelagem matemática são apresentadas na Tabela 4.11. Como esperado, os coeficientes k_{TM} e K , para a erva-mate que sofreu o tratamento da extração por fluido supercrítico foram maiores, já que esta matriz vegetal possui menor quantidade de cafeína. Já o coeficiente de determinação (R^2) elevado, para ambos os casos, denota que o modelo proposto se adequou aos dados experimentais obtidos. Além disto, o modelo pode servir para prever a quantidade de cafeína ingerida no preparo do chimarrão para outros tipos de erva-mate, sendo este o primeiro modelo proposto para tal fim.

Tabela 4.11 - Coeficiente interno de transferência de massa (k_{TM}), coeficiente de partição (K) e coeficiente de determinação do modelo matemático proposto para a extração do chimarrão.

	k_{TM}	K	R^2
Antes da Extração	$0,165956 \pm 0,106$	$0,0038 \pm 0,00029$	0,999553
Depois da Extração	$1,06104 \pm 0,084$	$0,0051 \pm 0,00031$	0,999534

4.2.3.7. *Análise e purificação do extrato*

4.2.3.7.1 Tratamento inicial do extrato

A concentração de cafeína obtida após o tratamento inicial para os extratos da Etapa 3 foi de $47,8\% \pm 2,8\%$. Já na determinação da atividade antioxidante o EC_{50} obtido nas análises foi de 0,80 g extrato/g DPPH, ou seja, é necessário 0,8 g de extrato para consumir 1 g de DPPH. Por sua vez, o ensaio utilizando a mesma metodologia de determinação de atividade antioxidante, porém com padrão de cafeína não foi capaz de reagir com o DPPH. Isto posto, podemos inferir que o restante da composição do extrato que é responsável pelas propriedades antioxidantes do extrato obtido. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Anesini e colaboradores (2012) que descreve a cafeína obtida de extratos de erva-mate como sendo um composto com ação pró-oxidante.

4.2.3.7.2 Planejamento experimental da purificação do extrato

O resultado dos 7 experimentos realizados com os extratos supercríticos, visando aumentar sua concentração em cafeína, são apresentados na Tabela 4.12. O experimento 6 foi o que apresentou maior concentração de cafeína, 92,34%, sendo este uma das replicatas do ponto central do experimento: 35 mg/mL de extrato seco em água e temperatura de 35 °C.

Tabela 4.12 - Resultados do planejamento de experimento por fatorial 2^2 da purificação do extrato de erva-mate da extração por fluido supercrítico.

Experimento	Concentração de extrato (mg/mL)	Temperatura (°C)	Concentração de Cafeína
1	-1	-1	85,43%
2	1	-1	87,90%
3	1	1	64,27%
4	-1	1	83,85%
5	0	0	88,85%
6	0	0	92,34%
7	0	0	86,91%

Com os dados obtidos para a concentração de cafeína no extrato foi ajustada uma equação polinomial de segunda ordem, utilizando *software Statistica 10®* (Equação 4.15). A partir desta equação é possível relacionar diretamente a concentração do extrato e a temperatura escolhidas durante o processo de purificação e avaliar suas influências para elevar a concentração de cafeína no extrato. A equação apresentada é referente aos valores codificados (-1 para a condição mínima, 0 para a condição média e 1 para a condição de máximo) das variáveis independentes e o coeficiente de determinação (R^2) obtido foi de 0,70. O baixo valor de R^2 obtido pode ser justificado pela baixa reprodutibilidade do experimento.

$$Y = 0,8422 - 0,0428 * X_1 - 0,0630 * X_2 - 0,055 * X_1 * X_2 \quad (4.15)$$

Ao analisar todos os resultados, é possível verificar que a temperatura de 45 °C não é a mais indicada, já que nesta condição se obteve menores concentrações de cafeína. Isto fica ainda mais destacado no experimento 3, ao combinar a temperatura de 45 °C com a concentração mais elevada de extrato. Isto resulta numa concentração de cafeína após o processo de 64,27%, sendo esta, o menor valor verificado. Os demais experimentos tiveram resultados semelhantes, demonstrando que nos intervalos estudados não há diferenças, o que pode ser verificado também na superfície de resposta do experimento apresentada na Figura 4.22. Ao utilizar-se temperaturas mais baixas as concentrações de cafeína são mais elevadas,

principalmente a baixas concentrações de extrato, isto é justificado que o aumento de temperatura, nestes casos, apenas favorece a transferência de massa dos compostos com baixa solubilidade em água. Na Figura 4.23 é apresentada uma imagem do extrato antes do processo de purificação (concentração de cafeína de 47,8%) e após o processo de purificação (concentração de cafeína de 92,3%), onde é possível visualizar a diferença na estrutura macroscópica e da coloração do extrato.

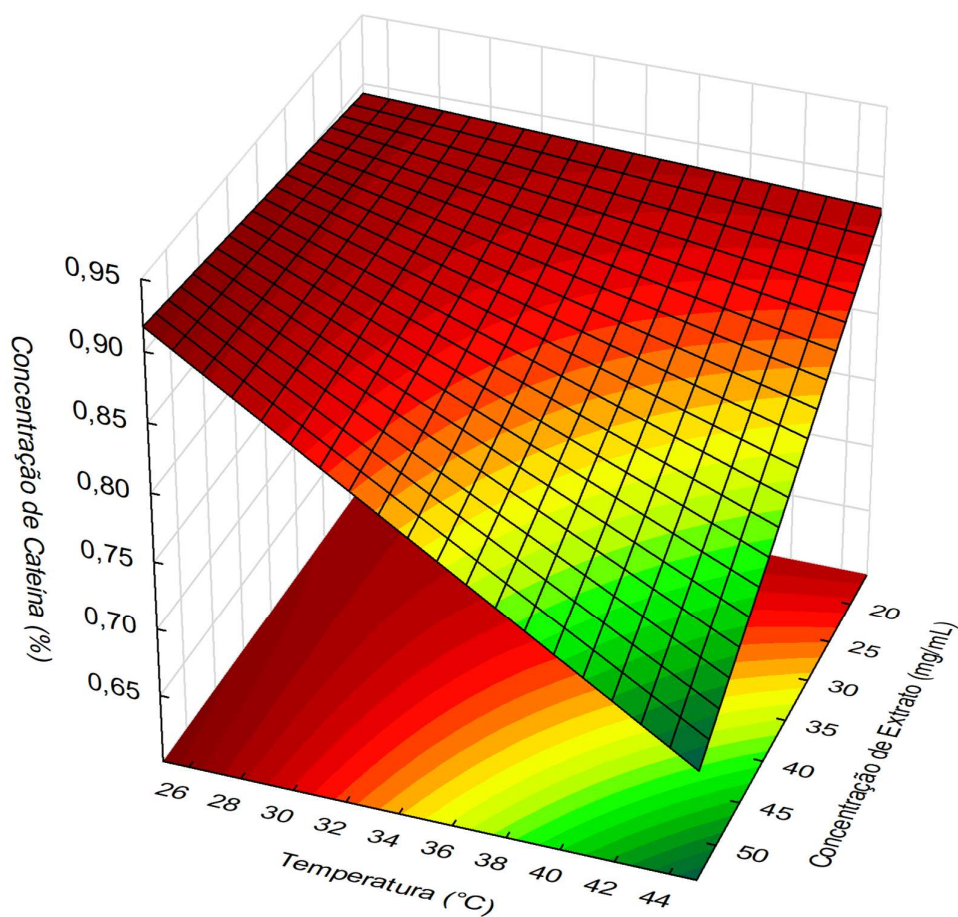


Figura 4.22 - Superfície de resposta da concentração de cafeína (m/m) no extrato purificado: temperatura versus concentração de extrato bruto.



Figura 4.23 – Imagem do extrato de erva-mate antes (esquerda) e depois (direita) do processo de purificação.

4.2.4. Conclusão

O processo de extração por fluido supercrítico foi capaz de diminuir a concentração de cafeína para níveis que são considerados descafeinados pela ANVISA (menor que 0,1% de concentração de cafeína). A otimização aplicada através de planejamentos experimentais resultou numa condição de extração capaz de obter erva-mate descafeinada em 4,25 h. A validação do método, utilizando uma amostra de erva-mate diferente da que foi usada na otimização do processo, resultou em concentração de cafeína de $0,163\% \pm 0,058\%$. O modelo matemático proposto para o processo de extração apresentou aderência aos dados experimentais, tanto para a massa de extrato total ($R^2 = 0,9983$), quanto para a massa de cafeína ($R^2 = 0,9898$). Por sua vez os parâmetros calculados, coeficiente de transferência de massa e ajustado e o coeficiente de partição, estão de acordo com o esperado e possuem ordem de grandeza de acordo com a literatura.

Verificou-se que a utilização de erva-mate após o processo de extração supercrítica diminui em 85,1% a ingestão de cafeína no consumo de chimarrão em

comparação a erva-mate tradicional. Além disso, foi desenvolvido um modelo matemático capaz representar o processo de extração de cafeína da erva-mate que ocorre no chimarrão. Os extratos aquosos obtidos das folhas de erva-mate não tiveram seu potencial antioxidante alterados após o processo de extração supercrítica. Também foi possível obter extratos purificados sem uso de solventes tóxicos, desde a extração até a purificação, com concentrações de cafeína de até 92,34%.

Os resultados obtidos também podem servir para ajudar a discussão no desenvolvimento de produtos descafeinados, ou com redução no teor de cafeína, de erva-mate. Atualmente no Brasil, os balizadores no que se diz respeito ao teor de cafeína em bebidas é o café, por se tratar de uma bebida bastante difundida. Porém, os resultados obtidos neste trabalho podem servir de subsídio para desenvolvimento de técnicas específicas para a erva-mate, levando em conta suas características biológicas e suas formas peculiares de consumo.

5. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

As atividades programadas e trabalhos futuros a serem desenvolvidas estão apresentadas abaixo:

1. Avaliar a utilização de outros tipos de erva-mate (cancheada e estacionado) para extração de cafeína por fluido supercrítico nas condições propostas neste trabalho.
2. Desenvolver uma metodologia capaz de avaliar a influência do processo extrativo por fluido supercrítico na coloração da erva-mate processada, visto que após a extração supercrítica é visível uma mudança na coloração da erva-mate.
3. Quantificar a alteração de outros compostos fitoquímicos presentes na erva-mate devido ao processo extrativo.
4. Desenvolver a metodologia proposta de purificação do extrato sem a utilização de solventes tóxicos avaliando outras variáveis para aumentar a concentração de cafeína.
5. Produção de nanocápsulas de cafeína extraída da erva-mate, através do revestimento das mesmas com quitosana, visando a liberação controlada no extrato na forma de produtos termogênicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLWOOD, J. W.; Goodacre, R. An Introduction to Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Instrumentation Applied in Plant Metabolomic Analyses. **Phytochemical Analysis**, v. 21 p. 33-47, 2010.

ALMEIDA, R.N.; Neto, R.G.; Barros, F.M.; Cassel, E.; von Poser, G.L.; Vargas, R.M. Supercritical extraction of *Hypericum caprifoliatum* using carbon dioxide and ethanol+water as co-solvent. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 70, p. 95-102, 2013.

ANESINI, C.; Turner, S.; Cogoi, L.; Filip, R. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*), **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, p. 299-304, 2012

ANVISA, BRASIL. Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005.

ARÇARI, D.P.; Bartchewsky, W.; dos Santos, T.W.; Oliveira, K.A.; Funck, A.; Pedrazzoli, J.; de Souza, M.F.F.; Saad, M.J.; Bastos, D.H.M.; Gambero, A.; Carvalho, P. O.; Ribeiro, M.L. Antiobesity Effects of yerba maté Extract (*Ilex paraguariensis*) in High-fat Diet-induced Obese Mice. **Obesity**, v.17, p. 2127–2133, 2009.

AZAM, S.; Hadi, N.; Khan, N. U.; Hadi, S. M. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Medical Science Monitor**, v. 9 p. BR325-BR330, 2003

BASTOS, D.H.M.; Fornari, A.C.; Queiroz, Y.S.; Torres, E.A.F.S. Bioactive Compounds Content Of Chimarrao Infusions Related To The Moisture Of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*) Leaves. **Brazilian Arch. Biol. Technol**, v. 49, p. 399–404, 2006.

BASTOS, D.H.M.; de Oliveira, D.M.; Matsumoto, R.L.T.; Carvalho, P. de O.; Ribeiro, M.L., Yerba maté: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v.1, p. 37–46, 2007.

BEN SGHAIER, M.; Pagano, A.; Mousslim, M.; Ammari, Y.; Kovacic, H.; Luis, J. Rutin inhibits proliferation, attenuates superoxide production and decreases adhesion and migration of human cancerous cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.84, p. 1972-1978, 2016.

BECKMAN, E. J. Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 28, p. 121-191, 2004.

BLUM-SILVA, C. H.; Chaves, V.C.; Schenkel, E.P.; Coelho, G.C.; Reginatto, F. H. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 1-6, 2015.

BLUM-SILVA, C. H.; Luz, A. B. G.; Nascimento, M. V. P. S.; Facchin, B. M. C.; Baratto, B.; Fröde, T. S.; Sandjo, L. P.; Dalmarco, E. M.; Reginatto, F. H. Qualitative and quantitative analysis data of the major constituents of *Ilex paraguariensis* leaves by UPLC-PDA and QTOF-MS. **Data in Brief**, v. 8, p. 295-299, 2016.

BORTOLI, P. M.; Alvesa C.; Costa E.; Vanin A. P.; Sofiatti J. R.; Siqueira D. P.; Dallago R. M.; Treichel H.; Vargas, G. D. L. P.; Kaizer R. R. *Ilex paraguariensis*: Potential antioxidant on aluminium toxicity, in an experimental model of Alzheimer's disease. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 181, p. 104-110, 2018

Box, G. E. P.; Behnken, D. W. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. **Theometrics**, v. 7, p. 455-475, 1960.

BRACESCO, N.; Sanchez, A.G.; Contreras, V.; Menini, T.; Gugliucci, A. Recent advances

on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378–384, 2011.

BRAND -WILLIAMS, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995

BRAVO, L., Goya, L., Lecumberri, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393–405, 2007.

BRITO, V.G.B; Chaves-Neto, A.H.; de Barros, T.L.; Oliveira, S.H.P. Soluble yerba mate (*Ilex Paraguariensis*) extract enhances in vitro osteoblastic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 244, p. 112131, 2019

BUTIUK, A.P.; Martos, M.A.; Adachi, O.; Hours, R.A. Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Effect of plant fraction, processing step and harvesting season. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, p. 27–33, 2016.

CARDOZO JUNIOR, E.L.; Morand, C., 2016. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440–454, 2016.

CASSEL, E.; Vargas, R.M.F.; Brun, G.W.; Almeida, D.E.; Cogoi, L.; Ferraro, G.; Filip, R. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 656–661, 2010.

CHAN, C. H.; Yusoff, R.; Ngoh, G. C. Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, p. 1169-1186, 2014.

CHEDEA, V. S.; POP, R. M. In: **Polyphenols in Plants (Second Edition)**. Total Polyphenols Content and Antioxidant DPPH Assays on Biological Samples, London, 2019, v. 11, p.169-183.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MATINEZ, J. R. Chlorogenic Acids and Purine Alkaloids Contents of Maté (*Ilex paraguariensis*) Leaf and Beverage. **Food Chemistry**, v. 35, p. 13-21, 1990

COLPO, A.C.; Rosa, H.; Lima, M.E.; Pazzini, C.E.F.; de Camargo, V.B.; Bassante, F.E.M.; Puntel, R.; Ávila, D.S.; Mendez, A.; Folmer, V. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. **Food Chemistry**, v. 209, p. 185–195, 2016

CRANK, J. **The Mathematics of Diffusion**, 2^a ed. Oxford: University Press, 1975. 414p.

CROSSLEY, J.J.; AGUILERA, J.M. Modeling the effect of microstructure on food extraction. **Journal Food Processing Engineering**, v. 24, p. 161-177, 2001.

CVEJIC, J. H.; Krstonosic M. A.; Bursac, M.; Miljic, U. In: **Nutraceutical and Functional Food Components**. Polyphenols. London, 2017, v. 7, p. 203-258.

DA SILVA, R. P. F. F.; Rocha-Santo, T. A. P.; Duarte, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.76, p. 40-52, 2016.

DA SILVA, C. G. F. **ESTUDO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE SAPONINAS DO FRUTO DE ERVA MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hill)**. Porto Alegre. 2017. 99p.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DA SILVA, C.G.F.; Cassel, E.; Vargas, R.M.F.; Marczark, L.D.F. Selective extraction of saponins from *Ilex paraguariensis* St.-Hil. unripe fruits. **Food and Bioprocess Processing**, v. 111, p. 72-82, 2018.

DA SILVEIRA, T.F.F.; Meinhart, A.D.; de Souza, T.C.L.; Cunha, E.C.E; de Moraes, M. R.; Godoy, H.T. Chlorogenic acids and flavonoid extraction during the preparation of yerba mate based beverages. **Food Research International**, v. 102, p. 348-354, 2017.

DASSOLF, E. S.; Li, Y. O. Mechanisms and effects of ultrasound-assisted supercritical CO₂ extraction. **Trends in Food Science & Technology**, v. 86, p. 492-501, 2019.

DE MELO, M. M. R.; Silvestre, A. J. D.; Silva, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 115-176, 2014.

DE SOUZA, L.M.; Dartora, N., Scoparo, C.T.; Cipriani, T.R.; Gorin, P.A.J.; Iacomini, M.; Sasaki, G.L. Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: Development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7307–7315, 2011.

DELAGE, E.; Bohuon, G.; Baron, A.; Drilleau, J.-F. High-performance liquid chromatography of the phenolic compounds in the juice of some French cider apple varieties. **Journal of Chromatography A**, v. 555, p. 125–136, 1991.

DO, T. K. T.; Hadji-Minaglou, F.; Antoniotti, S.; Fernandez, X. Secondary metabolites isolation in natural products chemistry: Comparison of two semipreparative chromatographic techniques (high pressure liquid chromatography and high performance thin-layer chromatography). **Journal of Chromatography A**, v. 1325, p. 256-260, 2014

EMA – European Medicines Agency. Assessment report on *Ilex paraguariensis* St. Hilaire, folium. Europa: Committee on Herbal Medicinal Products, 2010, 35p.

EMBUSCADO, M.E., 2015. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants - A mini review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 811–819, 2015

ESMELINDRO, M.C.; Toniazzo, G.; Waczuk, A.; Dariva, C.; de Oliveira, D. Caracterização Físico-Química Da Erva-Mate: Influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 199–204, 2002.

FALCÃO, M.A.; Scopel, R.; Almeida, R.N.; do Espírito Santo, A.T.; Franceschini, G.; Garcez, J.J.; Vargas, R.M.F.; Cassel, E. Supercritical fluid extraction of vinblastine from *Catharanthus roseus*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 129, p. 9-15, 2017.

FARAH, A.; Donangelo, C.M., 2006. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p. 23–36, 2006

FERNANDES, C.E.F.; Scapinello, J.; Bohn, A.; Boligon, A.A.; Athayde, M.L.; Magro, J.D.; Palliga, M.; Oliveira, J.V.; Tres, M.V. Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from erva-mate (*Ilex paraguariensis*) fruit using compressed propane and supercritical CO₂. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, p. 98-104, 2017.

FIANCO, A. L.; Lucas, A.M.; Fasolo, D.; Almeida, R.N.; Pippi, B.; Güez, C.M.; Fuentefria, A.; Vargas, R.M.F.V.; Teixeira, H.F.; von Poser, G.; Cassel, E. Polyphenylated benzophenone-enriched extracts obtained using SC-CO₂ from the dry ethanolic extract of Brazilian red propolis. **Separation Science and Technology**, v. 53, p. 1724-1731, 2018.

FILIP, R.; Lopez, P.; Coussio, J.; Ferraro, G.; 1998. Mate substitutes or adulterants: Study

of xanthine content. **Phytotherapy Research**, v.12, p. 129–131, 1998.

FRANCESCHINI, G. N. **Avaliação do efeito das variáveis de processo na descafeinização da erva-mate por extração com fluido supercrítico**. Porto Alegre. 2017. 77p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

FRANCHI, J. R. In: **Principles of Applied Reservoir Simulation**. Modern Flow Modeling Workflows. Cambridge, 2018, v. 12, p. 221-240.

FRANT, M.; Czajka, M.; Paduch, R. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) effect on human colon normal and tumor cells. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.3, p. 4730–4737, 2012.

FREDHOLM, B.; Battig, K.; Holmén, J.; Nehlig, A.; Zvartau, E. E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, v. 51, p. 83-133, 1999.

FUJIOKA, K.; Shibamoto, T. Quantitation of Volatiles and Nonvolatile Acids in an Extract from Coffee Beverages: Correlation with Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 6054–6058, 2006.

GUPTA, R B.; Shim, J. J. **Solubility in Supercritical Carbon Dioxide**, 1^a ed Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. 960p

GÓMEZ-JUARISTI, M.; Martíne-López, S.; Sarria, B.; Bravo, L.; Mateos, R. Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1028-1038, 2018

GÜLÇİN, İ. In vitro prooxidant effect of caffeine. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem**, v. 23, p. 149–152, 2008.

GULLÓN, B.; Eibes, G.; Moreira, M.T.; Herrera, R.; Labidi, J.; Gullón, B. Yerba mate waste: A sustainable resource of antioxidant compounds. **Industrial Crops & Products**, v. 113, p. 398-405, 2018

HECK, C.I.; de Mejia, E.G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72. p. R138-R151, 2007.

HECKMAN, M.A.; Sherry, K.; De Mejia, E.G. Energy Drinks: An Assessment of Their Market Size, Consumer Demographics, Ingredient Profile, Functionality, and Regulations in the United States. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 303–317, 2010.

HERRERO, M.; Cifuentes, A.; Ibañes, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. **Food Chemistry**, v. 98, p. 136-148, 2006.

HOLLOWARTY, S.A.; Trela, V.; Thea, A. E.; Scipioni, G.P.; Schmalko, G.P. Yerba Maté (*Ilex Paraguariensis* St. Hil.): Chemical and Physical Changes Under Different Aging Conditions. **Food Process Engineering**, v. 39, p. 19-30, 2016.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. 2010, 853p.

ISOLABELLA, S.; Cogoi, L.; López, P.; Anesini, C.; Ferraro, G.,; Filip, R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, p. 695–699, 2010.

JACQUES, R.A; Freitas, L.S.; Peres, V.F.; Dariva, C.; Oliveira, J.V.; Caramão, E.B. Chemical composition of mate tea leaves (*Ilexparaguariensis*): A study of extraction methods. **Journal of Separation Science**, v. 29, p.2780-2784, 2006.

JACQUES, R.A.; Freitas, L.S.; Peres, V.F.; Dariva, C.; Oliveira, A.P.; Oliveira, J.V.; Caramão, E.B. Chemical composition of mate tea leaves (*Ilexparaguariensis*): The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, p.6-12, 2007.

KIM, W.; Kim, J.; Kim, J.; Oh, S.; Lee, Y. Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 89, p. 303-309, 2008.

KNEZ, Ž.; Markočič, E.; Leitgeb, M.; Primožič, M.; Knez Hrnčič, M.; Škerget, M. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, v. 77, p. 235-243, 2014.

KOTOVICZ, V.; Zanoelo, E.F.; Hydrostatic pressure cycling extraction of soluble matter from mate leaves. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 656-665, 2013.

KOTOVICZ, V.; Wypych, F.; Zanoelo, E.F.; Pulsed hydrostatic pressure and ultrasound assisted extraction of soluble matter from mate leaves (*Ilex paraguariensis*): Experiments and modeling. **Separation and Purification Technology**, v. 132, p. 1-9, 2014.

KULSHRESTHA, S.; Sastry, S. Frequency and voltage effects on enhanced diffusion during moderate electric field (MEF) treatment. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 4, p. 189-194, 2003.

KULSHRESTHA, S. A.; Sastry, S. K. Low-frequency dielectric changes in cellular food material from ohmic heating: Effect of end point temperature. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 7, p. 257-262, 2006.

KUSNADI, C.; SASTRY, S. K. Effect of moderate electric fields on salt diffusion into vegetable tissue. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 329–336, 2012.

LIMA, N. S.; de Oliveira, E.; da Silva, A.P.S.; Maia, L. A.; de Moura, E.G.; Lisboa, P.C.

Effects of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) treatment on leptin resistance and inflammatory parameters in obese rats primed by early weaning. **Life Sciences**, v. 115, p. 29–35, 2014

LOGHAVI, L.; Sastry, S. K.; Yousef, A. E. Effect of Moderate Electric Field Frequency and Growth Stage on the Cell Membrane Permeability of *Lactobacillus acidophilus*. **Biotechnology Process**, v. 25, p. 85-94, 2009.

MÁRQUES, V.; Martínez, N.; Guerra, M.; Fariña, L.; Boido, E.; Dellacassa, E. Characterization of aroma-impact compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) using GC–olfactometry and GC–MS. **Food Research International**, v. 53, p. 808-815, 2013.

MAZZAFERA, P.; Baumann, T. W.; Shimizu, M. M.; Silvarolla, M. B.; Decaf and the Steeplechase Towards Decaffito-the Coffee from Caffeine-Free Arabica Plants. **Tropical Plant Biology**, v. 2, p. 63-76, 2009.

MAZZAFERA, P. Which is the by-product: caffeine or decaf coffee? **Food and Energy Security**, v. 1, p. 70-75, 2012.

MEINHART, A. D.; Bizzotto, C. S.; Ballus, C. A.; Poloni Rybka, A. C.; Sobrinho, M. R.; Cerro-Quintana, R. S.; Teixeira-Filho, J.; Godoy, H. T. Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58 (4), p. 2188-2193, 2010.

MERCALI, G. D.; Schwartz, S.; Marczak, L. D. F.; Tessaro, I. C.; Sastry, S. Effect of the Electric Field Frequency on Ascorbic Acid Degradation during Thermal Treatment by Ohmic Heating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 5865-5870, 2014.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 8^a ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2012.724p.

NELDER, J. A.; Mead, R. A simplex method for function minimization. **The computer journal**, v. 7, n. 4, p. 308-313, 1965.

PARK, H.; Lee, H.; Shin, M.; Lee, K.; Lee, H.; Kim, Y.; Kim, K.; Kim, K. Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1011–1017, 2007.

PEKER, H.; Srinivasan, M. P.; Smith, J. M.; McCoy, B. J. Caffeine Extraction Rates from Coffee Beans with Supercritical Carbon Dioxide. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 38, p. 761-770, 1992.

PEREIRA R. N.; Vicente, A. A. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. **Food Research International**, v. 43, p. 1936-1943, 2010

POLIDORO, A. S.; Scapin, E.; Malmann, M.; do Carmo, J. U.; Machado, M. E.; Caramão, E. B.; Jacques, R. A. Characterization of volatile fractions in green mate and mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC × GC/TOFMS). **Microchemical Journal**, v. 128, p. 118-127, 2016.

PUBCHEM. (desenvolvido por U.S. National Library of Medicine). Disponível em: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. Acessado em: 24/07/2019.

RAO, V. R. In: **Antioxidant Agents. Advances in Structure and Activity Relationship of Coumarin Derivatives**. Antioxidant Agents, London, 2016, v. 7, p. 137-150.

RESENDE, P. E.; de Verza, S. G.; Kaiser, S.; Gomes, L. F.; Kucharski, L. C.; Ortega, G. G. The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 735–740, 2012.

REVERCHON, Ernesto. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 10, p. 1-37, 1997

ROCHA, C.M.R.; Genisheva, Z.; Ferreira-santos, P.; Rodrigues, R.; Vicente, A. A.; Teixeira, J. A.; Pereira, R. N. Electric field-based technologies for valorization of bioresources. **Bioresource Technology**, v. 254, p. 325-339, 2018.

ROSSA, G.E.; Almeida, R.N.; Vargas, R.M.F.; Cassel, E.; & Moyna, G. Sequential extraction methods applied to piper hispidinervum: an improvement in the processing of natural products. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 96(3), p. 756-762, 2018.

RUFINO, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Moraes, S. M.; Sampaio, C. G.; Peres-Jimenez, J.; Fulgencio, D. S. C. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Fortaleza, EMBRAPA, 2007. ISSN 1679-6535.

SALDAÑA, M.D.; Mohamed, R.S.; Baer, M.G.; Mazzafera, P. Extraction of purine alkaloids from maté (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO₂. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, p. 3804–3808, 1999.

SANTOS, F.S.; Zeoula, L.M.; dos Santos, G.T.; Lima, L.S.; Dias, A.L.G.; Rufino, M.O.A.; Schogor, A.L.B.; De Marchi, F.E.; Petit, H.V. Intake, digestibility and milk production and composition of dairy cows fed different levels of Yerba Mate in the diet. **Animal Feed Science and Technology**, v. 230, p. 70-76, 2017.

SCHMALKO, M.E.; Alzamora, S.M. Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during Yerba Mate processing. **Drying Technology**, v. 19, p. 599–610, 2001.

SENSOY, I.; Sastry, S. K. Extraction using moderate electric fields. **Journal of food science**, v. 69, n. 1, p. FEP7-FEP13, 2004.

SILVA, J.J.; Puel, O.; Lorber, S.; Ferranti, L.S.; Ortiz, L.F.; Taniwaki, M.H.; Iamanaka, B.T.; Fungaro, M.H. Occurrence and diversity of *Aspergillus* in commercial yerba mate elaborated for the Brazilian beverage 'chimarrão'. **Food Research International**, v. 121, p. 940-946, 2019.

SINTOV, A. C.; Greenberg, I. Comparative percutaneous permeation study using caffeine-loaded microemulsion showing low reliability of the frozen/thawed skin models. **Pharmaceutical nanotechnology**, v. 471, p. 516-524, 2014.

SKOOG, D.A.; WEST, D.A.; HOLLER, F.J.; CROUCH, R.S. **Fundamentos de Química Analítica**. 8° ed. São Paulo: Thomson, 2008. 999 p.

SOARES, R.P.; Secchi, A.R.; In: **Computer Aided Chemical Engineering**. EMSO: A new environment for modelling, simulation and optimization. Elsevier, 2003. p. 947-952.

SOVOVÁ, H.; KUCERA, J.; JEZ, J. Rate of vegetable oil extraction with supercritical CO₂ - II. Extraction of grape seed oil. **Chemical Engineering Science**, v. 49, p. 415-420, 1994.

SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p.35-52, 2005.

STEINMANN, D.; Ganzera, M. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 744-757, 2011

TAYLOR, L. T. **Supercritical Fluid Extraction**. 2^a ed. New York: Wiley, 1996. 181p.

THEA, A. E.; Ferreira, D.; Brumovsky, L. A.; Schmalko, M. E. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil) traditional infusions (mate and tereré). **Food Control**, v. 60, p. 215-220, 2016.

VALCÁRCEL M.; Tena, M. T. Applications of supercritical fluid extraction in food analysis.

Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, v. 358, p. 561-573, 1997

VAUGHAN, N. P. The generation of monodisperse fibres of caffeine. **Journal of Aerosol Science**, v. 21, p. 453-462, 1990.

VOROBIEV, E.; Lebovka, N. **Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials**. 1^a ed. New York: Springer, 2008. 281p.

VOROBIEV, E.; Lebovka, N. I. Extraction of intercellular components by pulsed electric fields. In: **Pulsed electric fields technology for the food industry**. Springer, 2006. p.153–193.

WEBB, G. P. In: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. Dietary Supplements—A Classification and Overview of Uses and Efficacy. 2017

WILLS, B. A.; Napier-munn, T. J. In: **Wills' Mineral Processing Technology**. Modeling and Characterization. Oxford, 2016, v.17, p. 449-462.

YALKOWKY S.H.; He, Y.; Jain, P. **Handbook of Aqueous Solubility Data**. 2^a ed. Boca Raton: CRC Press, 2010 506 p.

ZULKAFI, Z. D.; Wang, H.; Miyashita, F.; Utsumi, N.; Tamura, K. Cosolvent-modified supercritical carbon dioxide extraction of phenolic compounds from bamboo leaves (*Sasa palmata*). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p. 123-129, 2014.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br